

**Untersuchungen zum mikrobiologischen
Antibiotika-Nachweis im Hühnerei**

Christel Müller-Held

1975

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern
Fachabteilung Geflügelgesundheitsdienst
Leitung: Prof. Dr. P. Dorn

Untersuchungen zum mikrobiologischen
Antibiotika - Nachweis
im Hühnerei

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Christel Müller-Held
aus
Krefeld-Ürdingen

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. P. Dorn

Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 21. Februar 1975



Meiner Tante in Dankbarkeit gewidmet

Für die freundliche Überlassung des
Themas und die mir zuteil gewordene
Unterstützung bei der Anfertigung
der vorliegenden Dissertation möchte
ich Herrn Prof. Dr. P. Dorn herzlich
danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A EINLEITUNG

1

B LITERATUR

1. Physiologische Voraussetzungen für
eine mögliche Antibiotika-Einlagerung
im Ei 2
2. Aufnahme, Resorption, Verteilung und
Ausscheidung der Antibiotika 4
3. Abhängigkeit der Rückstandsmenge und
-dauer im Ei von Dosis und Applika-
tionsart 8
4. Mikrobiologische Methoden zur Rückstands-
untersuchung im Hühnerei mit verschie-
denen Testkeimen 13
5. Beeinflussung der Hemmhofgröße im mi-
krobiologischen Hemmstofftest durch
physikalische und chemische Einwirkungen 19

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I MATERIAL UND METHODE

1. Testkeime 27
2. Nährböden 28
3. Ausgießen, Vordiffusion und Be-
brüten der Agar-Keimgemische 30

4. Standardlösungen	31
5. Untersuchungstechniken	32
6. Beurteilung des Hemmhofes	33
7. Technik der Eiuntersuchung	34
8. Versuchstiere und Fütterung	35

II ERGEBNISSE

1. Vergleichender Vorversuch mit Blättchen- test und Agar-Lochtest zum Hemmstoff- nachweis im Ei	36
2. Physikalische Einflüsse auf die Hemm- hofgrößen im Agar-Lochtest	41
3. Chemische Einflüsse auf die Hemmhof- größen im Agar-Lochtest	52
4. Nachweis von Chloramphenicol, Peni- cillin, Chlortetracyclin, Streptomycin und Erythromycin mit Bac. subtilis BGA (Agar p_H 6 und 8) im Tierversuch mit Bodenhaltung	59
5. Nachweis von Chloramphenicol, Peni- cillin, Chlortetracyclin, Streptomycin und Erythromycin mit Bac. subtilis BGA (Agar p_H 6 und 8), Bac. cereus ATCC 11778 und Sarc. lutea ATCC 9341 im Tierver- such mit Käfighaltung	67

D	<u>DISKUSSION</u>	84
---	-------------------	----

E	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	94
---	------------------------	----

F	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	98
---	-----------------------------	----

A

EINLEITUNG

Der Frage der Arzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischer Herkunft wird gegenwärtig erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet.

Über Arzneimittelrückstände im Ei liegen zwar Untersuchungen vor, praktikable Routine-Untersuchungstechniken fehlen jedoch bislang. Mir wurde die Aufgabe gestellt, Fragen zu diesem Komplex zu klären und an Modell-Tierversuchen die Praktikabilität des bakteriologischen Hemmstofftestes zu überprüfen.

B LITERATUR

1. Physiologische Voraussetzungen für eine mögliche Antibiotika-Einlagerung ins Ei

Das Ei ist Ablagerungsort für Nährstoffe (ILLES und SZENT-IVANY 1969), aber auch Pharmaka können dort in mehr oder minder starkem Maße abgelagert werden (JAKSCH 1971, KRIEG 1966 und 1972, GODGLÜCK 1972).

Arzneimittel gelangen über die Blutbahn in die Dotterkugel und über den Eileiter ins Eiklar (JAKSCH 1971). KRIEG (1966) und JAKSCH (1971) machten die Beobachtung, daß das einmal über das Blut in die Eifollikel gelangte Medikament von dort nicht mehr abgegeben wird. Je nach Entwicklungsstadium des Follikels und seiner Durchblutungsintensität muß nach temporärer Wirkstoffaufnahme mit Wirkstoffablagerung im Eidotter gerechnet werden.

In einem Versuch von KRIEG (1966) wurden Hennen 2 Std. nach der letzten Sulfamethazin-Gabe geschlachtet und untersucht. In kleinen Follikeln mit geringer Durchblutung fand sie relativ geringe Sulfonamid-Mengen, die größeren Follikel mit stärkerer Durchblutung enthielten entsprechend mehr Sulfamethazin. Nach ununterbrochener Sulfonamidbehandlung entsprachen die Konzentrationen in den Eifollikeln den Sulfamethazin-Konzentrationen im Blut.

WARREN und CONRAD (1939) und STURKIE (1965) geben die Dauer des Dotterbildungsprozesses mit 9 - 10 Tagen an. Infolge dieser Entwicklung sind frühestens 1 - 2 Tage nach der Antibiotika-Aufnahme Ablagerungen im Dotter zu erwarten und längstenfalls noch 9 Tage nach Absetzen nachweisbare Antibiotika-

Rückstände im Eigelb zu finden (RAICA et al. 1956).

RAICA et al. (1956) weisen nach Antibiotika-Rückstandsuntersuchungen jedoch darauf hin, daß mit der Papierblättchenmethode und *Bac. cereus* als Testkeim erst am 5. Tag nach Fütterungsbeginn Antibiotika im Ei nachzuweisen waren, die nur bis zum 4. Tag nach Absetzen des Medikaments meßbar waren. Dies führen die Autoren auf die ungenügende Sensibilität des mikrobiologischen Nachweises zurück.

Da der Durchmesser der Dotterkugel täglich 3-4 mm zunimmt (RAICA et al. 1956), kann man, vorausgesetzt, daß gleiche Mengen Ei gleiche Mengen Antibiotikum aufnehmen, mit an- und absteigenden Arzneimittelkonzentrationen während und nach der Verabreichung rechnen. Damit sind ab dem 9. - 10. Tag nach Fütterungsbeginn die größten Medikamentrückstände zu erwarten. Zu diesem Zeitpunkt werden die Eier gelegt, in deren Dotter von Anfang an Antibiotika eingelagert wurden (RAICA et al. 1956).

Diese Beobachtung wird in Untersuchungen von MERKENSCHLAGER (1962) bestätigt. Der Autor analysierte 2 Tage nach Verabreichung eines Chlortetracyclinhaltigen Futters das Medikament in der Außenschicht des Dotters. Mittelschicht und Dotterkern enthielten erst ab 4. - 5. Fütterungstag nachweisbare Chlortetracyclin-Mengen. Insgesamt konnten von ihm bis zum 7. - 9. Tag nach Absetzen des Antibiotikums Rückstände im Dotter erfaßt werden.

Da nach RAICA et al. (1956) die Antibiotika-Ablagerung bei ein- und derselben Henne nicht konstant ist, ist mit Schwankungen im Antibiotikum-Gehalt des Dotters verschiedener, nacheinander gelegter Eier zu rechnen.

2. Aufnahme, Resorption, Verteilung und Ausscheidung der Antibiotika

Die Menge der Antibiotika-Rückstände im Ei ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

a) Aufnahme der Antibiotika

Nach BRÜGGEMANN und MERKENSCHLAGER (1958) besteht eine Beziehung zwischen Futteraufnahme/kg KGW und Alter der Tiere. Sie beobachteten bei jüngeren Tieren eine wesentlich höhere Nahrungsaufnahme in Relation zu ihrem Körpergewicht als bei älteren Tieren. Demzufolge nehmen jüngere Tiere bei konstanten Antibiotika-Konzentrationen im Futter relativ mehr Wirkstoff auf als ältere Tiere.

LAI et al. (1972) berichten über eine Abhängigkeit der Futteraufnahme von der Tageszeit. Während bei den Junghennen der größte Teil der Tagesfuttermenge in den Morgenstunden aufgenommen wird, liegt bei den Legehennen der Prozentsatz in den Nachmittagsstunden, in Abhängigkeit vom Lichttag, am höchsten. Auch klimatische Verhältnisse (KRIEG 1966) und geschmackliche Komponenten, freie Futter- und Wasseraufnahme vorausgesetzt, lassen eine unterschiedliche hohe Aufnahme von Nähr- und Wirkstoffen erwarten.

b) Resorption, Verteilung und Ausscheidung der Antibiotika

Die Resorption der einzelnen Antibiotika ist nach oraler Verabreichung unterschiedlich hoch. Chloramphenicol und Penicillin werden im oberen Teil des Intestinaltraktes resorbiert. Während Chloramphenicol zu ca. 90 % resorbiert wird

(HELWIG 1970), liegen die Werte für Penicillin nach MERKENSCHLAGER (1962) bei 10 - 25%. Hinsichtlich des Penicillins berichtet FREERKSEN (1954) über eine relativ geringe Beständigkeit des Antibiotikums im Körper, da Magen- und Darmsaft inaktivierend wirken. Diese Beobachtung wurde durch Versuche mit radioaktiv markiertem Penicillin bestätigt (HAVERMANN und SCHARPENSEEL 1953). Diese Autoren stellten fest, daß das Penicillin zu 95 % organisch gebunden und kurzfristig über den Kot ausgeschieden wird.

Die Resorption des Chlortetracyclins erfolgt vorwiegend im Magen und in den oberen Dünndarmabschnitten (MERKENSCHLAGER 1962). Sie beträgt ca. 30 - 50 % der insgesamt aufgenommenen Menge (VOGT et al. 1972).

Nach KNOTHE (1966) ist bei Tetracyclin eine längere Verweildauer im Darm nachzuweisen als bei Chlortetracyclin.

Oral aufgenommenes Erythromycin wird im oberen Intestinaltrakt in Abhängigkeit von der Löslichkeit des jeweiligen Präparates resorbiert (WALTER und HEILMEYER 1965).

Streptomycin wird nach oraler Gabe nur geringfügig resorbiert (SCHREIBER 1967, HELWIG 1970).

Die Verteilung der Antibiotika im Körper erfolgt in erster Linie über die Blutbahn. Sie ist nach KNOTHE (1966) am Beispiel des Chlortetracyclins von der Dosis, der Applikationsart und der chemischen Zusammensetzung des Medikaments abhängig. Die bei den Sulfonamiden in ~~starke~~ Maße beobachtete Bindung an Serum-eiweiße (WALTER und HEILMEYER 1965, HELWIG 1970) spielt bei den Antibiotika ebenfalls eine Rolle. Man unterscheidet hier den Albumin- und den Globulintyp.

SCHREIBER (1967) und JAKSCH (1971) ordnen das Penicillin ebenso wie das Streptomycin dem Albumintyp zu. Die Tetracycline werden nach Angaben der beiden Autoren an Globuline gebunden.

Da die an Eiweiß gebundenen Pharmaka nicht frei diffundieren können, ergeben sich trotz hoher Blutspiegel nur geringe Gewebespiegel (JAKSCH 1971).

HELWIG (1970) gibt an, daß an Serumeiweiß gebundenes Antibiotikum im allgemeinen nur reversibel inaktiviert ist und im Sinne eines chemischen Gleichgewichtes wieder freigesetzt wird.

Nach HELWIG (1970) beträgt der Anteil des gebundenen Antibiotikums im Blut des Menschen für:

Penicillin:	in unterschiedlich hohem Maß reversibel gebunden
Chlortetracyclin:	64 - 69 %
Dihydrostreptomycin:	14 - 16 %
Erythromycin:	40 - 60 %

Ein bevorzugter Ablagerungsort für die Tetracycline sind Zähne und Knochen. Sie werden dort unter Bildung eines Chelatkomplexes inaktiviert (WALTER und HEILMEYER 1965, KNOTHE 1966).

Die Ausscheidung der Antibiotika aus dem tierischen Körper erfolgt über den Kot (HAVERMANN und SCHARPENSEEL 1953, FANGAUF 1954), den Urin (ROWLANDS et al. 1948, WALTER und HEILMEYER 1965), über die Milch (STORGARDS 1962, KRAAK und TOLLE 1967, LANG 1967) und über das EI BROQUIST und KOHLER 1953, DURBIN et al. 1953, RAICA et al. 1956,

FRYE et al. 1957, MERKENSCHLAGER 1962,
KRIEG 1966 und 1972, JÄGER 1972,
SCHELLHAAS 1973).

VOGT et al. (1972) sehen die Ablagerung der Antibiotika im Ei in Abhängigkeit von Resorption und Ausscheidungsprozeß und teilen dementsprechend die Antibiotika in 3 Gruppen ein:

1. Fast vollständig ausgeschieden, da nur unvollständig oder nicht resorbiert, werden folgende Antibiotika:
Bacitracin, Flavomycin, Neomycin, Streptomycin und Virginiamycin.
Bei diesen Antibiotika sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Rückstände im Ei zu erwarten.
2. Gut resorbiert, jedoch schnell ausgeschieden werden:
Erythromycin, Lincomycin, Oleandomycin, Penicillin, Tylosin.
Chloramphenicol dürfte aufgrund der Untersuchungen von WALTER und HEILMEYER (1965) und HELWIG (1970) in Gruppe 2 einzuordnen sein. Auch hierbei scheint keine allzugroße Rückstandsgefahr zu bestehen.
3. Gut resorbiert, jedoch relativ langsam ausgeschieden werden:
Spiramycin und die Tetracycline, sodaß hier mit Rückständen gerechnet werden muß.

3. Abhängigkeit der Rückstands-Menge und -Dauer
im Ei von Dosis und Applikationsart

Je nach Art des Therapeutikums, der Dosis, der Applikation und Dauer der Verabreichung ist mit Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft zu rechnen (CORETTI 1961).

a) Chloramphenicol

GODGLÜCK (1972) gelang es nach 4-tägiger Verfütterung von 500 ppm Chloramphenicol das Antibiotikum im Eiklar einen und im Eigelb noch 2 Tage nach Absetzen nachzuweisen. Er bediente sich dabei einer eigens dafür entwickelten mikrobiologischen Testmethode. Bei Gaben von 1.000 ppm wurden dagegen im Eiweiß noch 5 Tage und im Dotter noch 6 Tage lang Chloramphenicol-Rückstände festgestellt.

Aufgrund der guten Verteilung im Körper lagerte sich das Antibiotikum nach einer Einzeldosis von 60 mg/kg KGW mit der Sonde im Eiklar in meßbaren Konzentrationen ab (JÄGER 1972). Der Autor verwandte bei seinen Versuchen den Agar-Lochtest mit *Sarc. lutea* als Testkeim. SCHELLHAAS (1973) konnte nach 3-tägiger Verfütterung von 50 mg Chloramphenicol/Tier mit der Schlundsonde unter Verwendung des Agar-Lochtestes mit *Bac. subtilis* BGA keinen Rückstand in den Eiern nachweisen.

Nach 1-tägiger Verabreichung von 150 bzw. 235 mg Chloramphenicol/kg KGW über das Trinkwasser beobachtete JÄGER (1972) am folgenden Tag unterschiedlich hohe Antibiotika-Konzentrationen im Eiweiß, nicht aber im Dotter.

b) Penicillin

Hennen, die 2 Wochen lang 100 g Alleinmehl + 2 mg Penicillin/Tag erhielten, wurden anschließend täglich mit 8 mg ^{35}S -N-Äthylpiperidin Penicillin gefüttert. Außer schwachen Andeutungen auf radioaktive Spaltprodukte fanden sich im mikrobiologischen Test mit Staph. aureus SG 511 keine Anzeichen einer Antibiotika-Ablagerung im Ei (HAVERMANN und SCHARPENSEEL 1953). Untersuchungen von WONG et al. (1953) mit den gebräuchlichen bakteriologischen Methoden verliefen nach 12-wöchiger Fütterung von 1.000 ppm Penicillin bzw. Terramycin^(R) ebenfalls negativ. Auch FRYE et al. (1958) konnten nach Verfütterung von 1.000 ppm Penicillin mit den von GROVE und RANDALL (1955) vorgeschlagenen Untersuchungsmethoden keine meßbaren Antibiotika-Rückstände im Ei ermitteln. Bisher gelang es lediglich SCHELLHAAS (1973) mit Bac. subtilis BGA nach 3-tägiger Verabreichung von 300.000 I.E. Penicillin-G-Natrium mittels der Schlundsonde am 3. Tag den Nachweis des Antibiotikums im Eiklar und am 4. Tag im Eigelb zu führen.

c) Chlortetracyclin (CTC)

GODGLÜCK (1972) gelang der Chlortetracyclin-Nachweis im Ei mit Dosierung ab 100 bzw. 200 ppm über das Futter. Er verwandte dazu eine in eigenen Untersuchungen entwickelte, nicht näher definierte, mikrobiologische Nachweisttechnik. Nach Verfütterung von 200 ppm CTC fanden DURBIN et al. (1953) CTC-Rückstände von 0,03 - 0,13 mcg/g Ei im mikrobiologischen Test. Bereits zwei Tage

nach Absetzen des Antibiotikums konnten keine Rückstände mehr ermittelt werden. Nach Gaben von 2.000 ppm CTC wurden Höchstwerte von 0,71 mcg/g Ei gemessen. Die Antibiotika-Konzentrationen ließen sich bei dieser Dosierung noch ein bis zwei Wochen in fallenden Werten nachweisen.

MERKENSCHLAGER (1962) analysierte nach Verabreichung von 250 ppm CTC im Blättchentest mit *Bac. cereus* var. *mycoides* ATCC Nr. 10702 Höchstwerte von 0,028 mcg CTC/ml Eiweiß bzw. 0,068 mcg/CTC/ml Eigelb.

RAICA et al. (1956) bediente sich in seinen Versuchen ebenfalls des Blättchentests mit *Bac. cereus* ATCC 10702 als Testkeim. Er verfütterte 2 - 3 Wochen lang 50, 100 und 200 ppm mit negativem Ergebnis. Bei einer Verabreichung von 500, 1000 und 2000 ppm CTC über 16 Tage waren nach 4 - 7 Tagen die ersten Antibiotikamengen im Ei nachweisbar. Durchschnittlich 4,1 Tage nach Absetzen der Antibiotika wurden keine Rückstände mehr gefunden.

Bei der Dosierung von 500 ppm CTC wurden in der ersten Fütterungswoche Konzentrationen von durchschnittlich 0,018 bis 0,041 mcg/ml, in der zweiten Woche 0,020 - 0,141 mcg/ml und nach Absetzen 0,018 - 0,050 mcg/ml gemessen.

Bei der Dosierung von 1000 ppm CTC wurden in der ersten Woche Rückstände von durchschnittlich 0,018 - 0,106 mcg/ml, in der zweiten Woche 0,021 - 0,136 mcg/ml und in der nächsten Woche 0,027 - 0,080 mcg CTC pro ml gefunden.

Die Durchschnittswerte der Gruppe mit 2000 ppm CTC im Futter lagen bei 0,020 - 0,056 mcg/ml, 0,026 - 0,096 mcg/ml und 0,018 - 0,072 mcg CTC pro ml.

Interessant ist, daß sich die oben aufgeführten

CTC-Konzentrationen im Ei trotz unterschiedlich hoher Dosierung nicht wesentlich unterscheiden. In einem Fütterungsversuch von FRYE et al. (1958) erhielten Legehennen jeweils 1000 ppm CTC, Oxytetracyclin, Penicillin, Bacitracin und Streptomycin. Die Autoren konnten dabei mit Hilfe der von GROVE und RANDALL (1955) entwickelten mikrobiologischen Untersuchungstechniken CTC als einziges Antibiotikum in einer Dosierung ab 750 ppm im Gesamtei, und ab 500 ppm im Dotter nachweisen. Als Grund für die Erhaltung der mikrobiologischen Aktivität des CTC im Dotter macht WOMACKS (1949) eine Polysaccharidfraktion im Eigelb verantwortlich. BRÜGGEMANN et al. (1963) fütterten drei Legehennen 15 Tage lang 50 ppm eines C-14-markierten CTC und untersuchten die höchstens 24 Stunden alten Eier mit Hilfe des Agar-Diffusions-Tests und dem Testkeim *Bac. cereus* var. *mycoides* (ATCC 9634). Es ließen sich jedoch keine mikrobiologischen Aktivitäten nachweisen, wohl aber wurden radioaktiv markierte Spaltprodukte registriert. Einem Bericht von FREERKSEN (1954) zufolge konnte CTC, das über einen längeren Zeitraum in Dosierungen bis zu 150 ppm gefüttert wurde, in den Eiern mittels einer mikrobiologischen Methode nicht mehr nachgewiesen werden. Auch JUKES (1954) schreibt, daß bei einer Gabe von 200 ppm CTC im Futter kein Hinweis auf das Pharmakon im Ei gegeben war. SCHELLHAAS (1973) verabreichte 3 Hennen drei Tage hintereinander 75 mg CTC pro Tier und Tag mit der Schlundsonde und konnte im Agar-Lochtest mit *Bac. subtilis* als Testkeim keinen CTC-Nachweis im Ei erbringen.

Auch 300 mg CTC pro Liter Trinkwasser führte bei einer Applikation über drei Tage zu keinen meßbaren Antibiotika-Rückständen im Ei (SCHELLHAAS 1973).

d) Streptomycin

Aufgrund der schlechten oralen Resorption konnten trotz Dosierungen von 1000 ppm mit den mikrobiologischen Nachweis-Methoden nach GROVE und RANDALL (1955) keine Rückstände im Ei ermittelt werden (FRYE et al. 1958). Auch SCHELLHAAS (1973), der 3 Tage lang 350 mg Streptomycin-Sulfat/Tier mit der Sonde verabreichte, konnte im Agar-Lochtest mit Bac. subtilis BGA keine meßbare Antibiotika-Konzentration im Ei ermitteln.

e) Erythromycin

GODGLÜCK (1972) beobachtete mit seiner mikrobiologischen Nachweis-Methode Erythromycin-Rückstände in Eiern, die bis zu einer Woche nach Absetzen des Antibiotikums meßbar waren.

4. Mikrobiologische Methoden zur Rückstands- untersuchung im Hühnerei mit verschiedenen Testkeimen

Im allgemeinen werden zu Rückstandsunter-
suchungen auf Antibiotika im Ei mikrobiolo-
gische Testverfahren verwandt. Mit ihnen
lassen sich lediglich die mikrobiologisch
aktiven Bereiche der Substanzen nachweisen,
während mit chemisch analytischen Methoden
zusätzlich die gebundenen und metabolisierten
Anteile der Antibiotika gemessen werden.

Der Agar-Diffusionstest ist die bislang ge-
bräuchlichste Nachweis-Methode für Antibiotika.
Geeignete Techniken für Routineuntersuchungen
im Ei sind:

der Blättchentest
der Agar-Lochtest

Weitere Möglichkeiten der Materialauftragung
werden vor allem bei Futtermittel- und Fleisch-
untersuchungen angewandt:

die Zylinder-Methode
das Gefrierblockverfahren
die Auflegemethode ohne
Vorbereitung des Materials

Als Beurteilungskriterium für die mikrobiolo-
gische Aktivität der Antibiotika dient die
Wachstumshemmung der einzelnen Testkeime. Die
gebräuchlichsten Testkeime sind:

a) Sarc. lutea

SABATH et al. (1968) gab im Zylinder-Platten-test mit *Sarc. lutea* 3 mcg/ml als unterste Nachweisgrenze für eine Chloramphenicol-Lösung an. Von einigen Autoren wird *Sarc. lutea* ATCC 9341 zur Untersuchung von Tylosintartrat (SAIF et al. 1970) und zur Messung von Chlor-tetracyclin, Penicillin und Chloramphenicol herangezogen (TACACS und KOVACS 1969).

JÄGER (1972) gelang der Chloramphenicol-Nachweis im Eiklar mit *Sarc. lutea* ATCC 9341 ab einer Konzentration von 2 mcg/ml. Er bediente sich dabei einer modifizierten Form des Agar-Lochtests nach GROVE und RANDALL (1955).

b) Staph. aureus

In vergleichenden Untersuchungen von KIND (1966) besaß *Staph. aureus*, gefolgt von *Bac. subtilis* die größte Empfindlichkeit gegenüber den verwandten Antibiotika-Reinsubstanzen.

KNOTHE und MAHLER (1959) und KAMPELMACHER et al. (1962) empfehlen zum Nachweis der Tetracycline *Staph. aureus* als Testkeim.

TACACS und KOVACS (1969) schlagen *Staph. aureus* zur Untersuchung folgender Antibiotika vor: Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Erythromycin, Penicillin und Streptomycin.

DRAHEIM (1971) stellte fest, daß *Staph. aureus* SG 511 bei Oxytetracyclin und Penicillin ausgeprägte Wachstumshemmungen hervorruft, aber gegenüber Streptomycin und Chloramphenicol nahezu unempfindlich ist. Ein weiterer Nachteil stellt der Sensibilitätsverlust nach mehreren Nährbodenpassagen dar (DRAHEIM 1971).

GISSKE et al. (1970) machten die Erfahrung, daß Staph. aureus gegenüber den derzeitigen Futtermittelzusätzen (Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Flavomycin, Bacitracin, Oleandomycin) nicht ausreichend sensibel ist.

HAVERMANN und SCHARPENSEEL (1953) wiesen mit Staph. aureus SG 511 Konzentrationen von 0,04 - 0,05 I.E. Penicillin im Ei nach.

c) Bac. subtilis

Bei vergleichenden Untersuchungen mit Micrococc. aureus, Bac. cereus und Bac. subtilis zeigte letzterer die größte Empfindlichkeit gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika (BONFERT und BERANG 1969, GISSKE et al. 1970, MEYER et al. 1970).

SCHAAL (1972) kam zu dem Ergebnis, daß sich die Bac. subtilis-Stämme in der aufgeführten Reihenfolge für die Untersuchung der gebräuchlichen Antibiotika eignen:

Bac. subtilis Bremen
Bac. subtilis 165
Bac. subtilis ATCC 6633
Bac. subtilis BGA

TACACS und KOVACS (1969) stellten fest, daß sich Bac. subtilis ATCC 6633 besonders zum Nachweis von Chlortetracyclin, Erythromycin und Streptomycin eignet. KLEIN (1957) empfiehlt den Testkeim ebenfalls für Untersuchungen auf Chloramphenicol, Penicillin, Streptomycin und Erythromycin. Gegenüber Bacitracin und Polymycin zeigt der Nachweis mit Bac. subtilis nach den Aussagen von BONFERT und BERANG (1969) und CORETTI (1961) unzureichende Empfindlichkeit.

Seit einiger Zeit wird Bac. subtilis mit Agar p_H 6 und 8 als Testkeim bei der Untersuchung des Fleisches auf Hemmstoffe benutzt (Arbeitsanweisung zur Rückstandsuntersuchung AB.A 1974).

LEVETZOW (1971) gibt folgende Grenzwerte für Bac. subtilis BGA an:

Tabelle 1

In-vitro-Empfindlichkeit des Allgemeinen Hemmstofftests nach LEVETZOW (BGA 1971).

Erfasste Grenzkonzentration (I.E. bzw. mcg/ml).

Testsubstanz	p_H Agar 6,0	p_H Agar 8,0	
Penicillin-G-Natrium	0,5	0,5	mcg/ml
Erythromycin	50	10	"
TC-Hydrochlorid	5	10-100	"
Streptomycinsulfat	200	10- 50	"
Chloramphenicol	100	100-250	"
Chlortetracyclin	1-2	5- 10	"

Infolge des Doppelansatzes mit Agar p_H 6 und 8 liegen für die gebräuchlichen Antibiotika annähernd optimale Wirkungsbereiche vor. Aus diesem Grunde ist diese Nachweismethode für Rückstandsuntersuchungen nach SCHAAL (1972) besonders geeignet. Die unterschiedliche Nachweisgenauigkeit dieses Testverfahrens gegenüber den genannten Antibiotika darf jedoch nicht übersehen werden.

SCHELLHAAS (1973) führte quantitative Ei-Untersuchungen im Agar-Lochtest mit *Bac. subtilis* BGA als Testkeim durch.

Nach 3-tägiger Verabreichung von 300.000 I.E. Penicillin-G-Natrium mit der Sonde über 3 Tage konnte SCHELLHAAS (1973) bei einem Teil der Eier sowohl im Eiklar als auch im Dotter Rückstände erbringen. Bei der Verfütterung von 125 mg Spiramycinadipat und 200 mg Tylosintartrat über 3 Tage mit der Sonde konnten lediglich im Eiweiß Antibiotika-Nachweise geführt werden.

Nach intramuskulärer Injektion von 300 mg Streptomycinsulfat gelang ihm im Gegensatz zur oralen Verabreichung der Streptomycin-Nachweis sowohl im Eiklar als auch im Dotter.

d) Bac. cereus

In einem Versuch von OTTE (1960) mit *Bac. cereus* betrug die Nachweisgrenze für Tetracyclin-Hydrochlorid-Lösung 0,1 - 0,8 mcg/ml.

OVERBY (1954) empfiehlt *Bac. cereus* für Streptomycin-Bestimmungen in der Milch.

LEVETZOW (1971) kommt nach Versuchen mit Oxid-Teststernen zu dem Ergebnis, daß zum Nachweis von Antibiotika-Rückständen im Fleisch in erster Linie *Bac. cereus* und *Bac. subtilis* geeignet seien.

BRÜGGEMANN et al. (1963) untersuchten Eiweiß und Eigelb auf Chlortetracyclin-Rückstände. Sie verwendeten bei ihren Untersuchungen *Bac. cereus* var. *mycoides* ATCC 9634 mit einer unteren Nachweisgrenze von 0,02 mcg/ml.

RAICA et al. (1956) führten einen Chlortetracyclin-Nachweis im Ei mit der Papierblättchenmethode nach GRADY und WILLIAMS (1953) durch. Mit *Bac. cereus* ATCC 10702 konnten dabei Konzentrationen bis zu 0,025 mcg/ml nachgewiesen werden.

e) *Bac. stearothermophilus*

In Milch- und Fleischuntersuchungen wird *Bac. stearothermophilus* häufig verwandt (KUNDRAT 1968 und 1972, KOTTER 1973, TERPLAN et al. 1973). KUNDRAT entwickelte 1972 einen Schnelltest, der innerhalb von 45 Minuten mit Hilfe eines Farbindikators einen Hemmstoffnachweis in tierischen Produkten bringt. In Folge der hohen Bebrütungstemperatur von + 65°C werden störende Begleitkeime in ihrem Wachstum gehemmt.

5. Beeinflussung der Hemmhofgröße im mikrobiologischen Hemmstofftest durch physikalische und chemische Einwirkungen

Die meßbaren Antibiotika-Aktivitäten im mikrobiologischen Nachweisverfahren werden in der Größe des Hemmhofes ausgedrückt. Diese Hemmhofgröße ist von verschiedenen Einflüssen physikalischer und chemischer Natur abhängig.

a) Physikalische Einwirkungen

- 1) p_H - Wert: Der optimale p_H - Wert ist von wesentlichem Einfluß auf die Wirksamkeit der Antibiotika.

Chloramphenicol entfaltet nach HALLMANN (1961) zwischen p_H 3 und 8 seine größte Wirksamkeit. Nach SCHAAL (1972) zeigt dieses Antibiotikum bei p_H 6 und 8 gleiche mikrobiologische Aktivitäten.

Penicillin besitzt ein optimales Wirkungsspektrum im sauren Bereich bei p_H 6 (KUNDRAT 1968). Nach WALTER und HEILMEYER (1965) ist es zwischen p_H 4 und 8 voll wirksam.

Der optimale Wirkungsbereich für Chlortetracyclin liegt zwischen p_H 2,5 bis 4,5.

Das Antibiotikum soll vor p_H - Werten über 6,1 geschützt werden (HALLMANN 1961).

Streptomycin ist im alkalischen Bereich aktiver als im sauren (KLEIN 1957, KUNDRAT 1968). Deshalb empfiehlt KLEIN (1957) den Nährboden für den Streptomycin-Nachweis auf Agar p_H 7,8 einzustellen.

Die optimale antibiotische Wirkung entfaltet Erythromycin bei p_H 8. Es ist dort ungefähr 10 mal stärker wirksam als bei p_H 6,5 (KLEIN 1957).

Da die Hemmhofgrößen von den optimalen p_H - Werten der Nährmedien abhängig sind, ergeben bei

p_H 6 Chlortetracyclin und
Penicillin

p_H 8 Erythromycin und
Streptomycin

die größten Hemmhöfe (KLEIN 1957, SCHAAL 1972). Chloramphenicol zeigt nach SCHAAL (1972) und KLEIN (1957) keine markante p_H -Abhängigkeit.

In diesem Zusammenhang erscheinen auch die p_H -Wertverschiebungen im Ei bedeutsam. Nach längerer Lagerung der Eier kommt es zu einem CO_2 -Verlust im Eiweiß (SMITH 1931).

Die Folge davon sind p_H -Wertveränderungen, die innerhalb von 12 Tagen (VOITELLIER et al. 1964) zu Anstiegen von p_H 7,92 (ERIKSON et al. 1964) bzw. 8,2 (ULLRIK und DAVIDSEN 1964) auf p_H 9,9 im Eiweiß führen. Nach längerer Lagerung nähern sich die p_H -Werte des Eiklars wieder dem neutralen Bereich (GRZIMEK 1964).

Der p_H -Wert des Dotters liegt im Bereich von 6,3 (ERIKSON et al. 1964) und steigt nur unwesentlich an .

- 2) Wärme: Nach WALTER und HEILMEYER (1965) ist eine auf 100°C erhitzte Chloramphenicol-Lösung noch 5 Stunden aktiv. KLEIN (1957) konnte keinen wesentlichen Aktivitätsverlust nach mehrstündigem Erhitzen feststellen.

Nach KUNDRAT (1968) wird Penicillin durch eine zu hohe Brutschranktemperatur inaktiviert.

Streptomycin besitzt nach WALTER und HEILMEYER (1965) eine relativ große Hitze-resistenz. Bei 30 Minuten Erhitzung auf 70°C ist keinerlei Inaktivierung feststellbar, erst bei 10-minütiger Erhitzung auf 100°C sind Aktivitätsverluste bis 50 % zu verzeichnen.

- 3) p_H-Wert und Wärme: Schon Werte über p_H 6,1, Licht und Wärme vermögen die Chlortetracyclinwirkung zu mindern. Nach 24-stündigem Brutschrankaufenthalt bei 37°C und p_H 7,2 ist Chlortetracyclin zu 96 bis 98% zerstört (KLEIN 1957, HALLMANN 1961, KUNDRAT 1968). WALTER und HEILMEYER (1965) sehen die Hitze-resistenz des Chlortetracyclins in Abhängigkeit vom jeweiligen p_H-Wert.

Nach 24-stündiger Bebrütung bei $+ 37^{\circ}\text{C}$ und p_H 7,4 bleibt die antibiotische Wirkung des Erythromycins voll erhalten (KLEIN 1957).

- 4) Diffusionen: Hinsichtlich der Diffusionsgeschwindigkeit kann man die Antibiotika in zwei Gruppen einteilen. Während Tetracycline, Penicillin, Chloramphenicol und Streptomycin relativ schnell diffundieren, dringt Erythromycin nur langsam in das Medium ein (KLEIN 1957).

Die Folge davon ist, daß bei den erstgenannten Wirkstoffen größere Hemmradien entstehen - gleiche Nährböden vorausgesetzt - als bei Erythromycin (GERLACH 1967).

Um den Antibiotika die Möglichkeit zu geben, in das Nährmedium einzudringen, läßt man die vorbereiteten Platten vordiffundieren. Hinsichtlich Art und Dauer der Vordiffusion findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. Während KLIMA (1966) und DRAHEIM (1971) die mit Organproben beschichteten Platten drei bzw. vier Stunden zur Vordiffusion in den Kühlschrank stellten, lagerten BRÜGGEMANN et al. (1963) die Petrischalen mit dem Eimaterial nur 1 Stunde im Kühlschrank bei + 4°C.

JÄGER (1972) ließ sein Ei -Untersuchungsmaterial in 2-stündiger Lagerung bei Zimmertemperatur vordiffundieren.

MEYER et al. (1970) kamen zu dem Ergebnis, daß nach Vordiffusion im Kühlschrank bessere Hemmhöfe auftraten als nach sofortigem Bebrüten.

b) Chem. Einwirkungen-Lysozyme

Schon 1909 (LASCHTSCHENKO) bzw. 1912 entdeckten RETTGER und SPERRY, daß im Eiweiß bakterien- und sporentötende Substanzen vorhanden sind. FLEMING charakterisierte sie 1922 als Lysozyme. 1937 wurden sie erstmalig von ABRAHAM und ROBINSON aus dem Eiklar kristallisiert. Sie machen 0,36 - 0,47 % des flüssigen Eiklars aus und besitzen sowohl in den dünn- als auch in den

dickflüssigen Eiklarschichten die gleiche Aktivität (COTTERILL und WINTER 1954). ALDERTON et al. (1954) und COTTERILL und WINTER (1954) fanden den Lysozymgehalt im frischen Eiweiß relativ konstant.

Studien von COTTERILL und WINTER (1954) zeigten, daß die Lysozymgehalte der Eier bei verschiedenen Hennen schwanken, bei ein und derselben Henne jedoch auf gleicher Höhe bleiben. Untersuchungen von WILCOX und COLE (1954) bestätigen dieses Ergebnis. Mit zunehmendem Alter des Tieres zeichnet sich allerdings ein Sinken des Lysozymgehaltes im Ei ab (WILCOX 1956).

Chemisch gesehen stellen die Lysozyme hoch basische Proteine dar (CUNNINGHAM und LINEWEAVER 1967, CUNNINGHAM und COTTERILL 1971) deren p_H -Optimum bei 5,3 liegt (ABDERHALDEN 1958). Ihr Molekulargewicht wird nach JOLLE (1960) mit 14.500, nach HOFFMANN-OSTENHOF (1954) mit 14.700 angegeben.

BORDES (1928) beobachtete, daß Lysozyme sehr hitze- und säurelabil sind.

Hemmend wirken sollen Alkalien, Schwermetalle, Peroxyde, Formaldehyd, Jod, Galle und Pepsin, während Kasein, NaCl, Vit. A und C, Nikotinsäure und einige Sulfonamide die Lysozymaktivität verstärken (HOFFMANN-OSTENHOF 1954).

ILLES und SZENT-IVANY (1969) stellten in ihren Versuchen fest, daß das Lysozym im Eiweiß in einer Konzentration von 1,5 g seine antibakterielle Aktivität entfaltet.

Diese bakteriolytische Eigenschaft beruht auf der Spaltung der Acetylaminopolysaccharide, die mit 3 - 5 % (HOFFMANN-OSTENHOF 1954) Bestandteil der Zellmembran vieler Bakterien sind. So werden die Zellmembranen von *Sarc. lutea*, *Micrococc. lysodeiktikus*, *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericum* in Glucose und Hexosamin zerlegt (AMMON 1959). Die nahezu vollständige Auflösung des aus *Micrococc. lysodeiktikus* isolierten Mucopolysaccharids wurde von MEYER und HAHNEL (1946) zum Nachweis der Lysozymwirkung empfohlen.

Versuch zur Ausschaltung der Lysozymaktivität

Einige Autoren haben sich um die Inhibierung der Lysozymaktivität bemüht:

1) durch p_H -Wert-Veränderungen:

MEYER et al. (1936) stellten fest, daß eine 10-minütige Einwirkung von 0,01 nNaOH bei Raumtemperatur die Lysozymaktivität des Eiklars von 3.000 auf 80 Einheiten/g senkt. In Arbeiten von GALYEAN et al. (1972) wurden demgegenüber keine Änderungen der Lysozymaktivität bei verschiedenen p_H -Werten des Eiklars registriert.

2) durch Erhitzen:

Reines Eiweiß auf 50 - 56°C erhitzt, zeigt eine erhöhte Lysozymaktivität, die bei Erwärmung über 60°C zurückgeht (GALYEAN et al. 1972).

COTTERILL und WINTER (1954) beobachteten nach 10-minütiger Erhitzung des Eiklars auf $55 - 58^{\circ}\text{C}$ bzw. nach noch stärkerer Erwärmung in entsprechend kürzerer Zeit ein starkes Absinken der Lysozymaktivität, die bei 7 Tage alten Eiern größer war als in den nur 1 Tag alten Eiern. Sie führen diese Erscheinung auf den nach längerer Lagerung in den alkalischen Bereich ansteigenden p_H -Wert zurück.

SHELLHAAS (1973) erhitzte Eiweiß, das im Ultraturax homogenisiert wurde, 15 Min. lang auf 70°C und konnte im mikrobiologischen Hemmstofftest keine Lysozymaktivität mehr feststellen.

3) durch Erhitzung und p_H -Wert-Veränderung:

Hoch basische Lysozyme sind in der Lage, mit anderen Substanzen wie Ovalbumin, Ovomucin und Conalbumin elektrostatische Komplexe einzugehen (CUNNINGHAM et al. 1971).

In Gegenwart von Ovalbumin und Erhitzung auf 60°C für 10 Minuten erschien das Lysozym sehr instabil. Bei doppelter Ovalbuminzugabe war die Inaktivierung des kristallinen Lysozyms infolge Bildung eines unlöslichen Präzipitats bei p_H 9 stärker als bei p_H 8. Für Avidin, Conalbumin und Ovomucin mußten zur Inaktivierung stärkere Konzentrationen gewählt werden als sie natürlicherweise im Ei vorkommen (CUNNINGHAM und LINEWEAVER 1967). 5-minütige Erhitzung auf 100°C bei p_H 9 zerstörte den größten Teil der Lysozymaktivität (MEYER et al. 1936).

4) durch Dotter-Einwirkung:

Schon FLEMING und ALLISON (1924) beobachteten einen hemmenden Einfluß des Dotters auf das Eiklar-Lysozym.

CUNNINGHAM und COTTERILL (1971) konnten anhand der Elektrophorese diese Ergebnisse bestätigen. Bei 5 % Eigelbzusatz und einer Pufferlösung von p_H 6,2 sank die lytische Aktivität des gereinigten Lysozyms auf weniger als 10 %.

5) durch Harnstoff-Merkaptoäthanol:

Bei Zimmertemperatur läßt sich die Lysozymaktivität des Eiklars mittels Harnstoff und Merkaptoäthanol ausschalten (FRAENKEL-CONRAT et al. 1951).

6) durch Dialyse:

Auf einer ganz anderen Basis liegt die Ausschaltung der Lysozyme wie sie von TERPLAN et al. (1972) empfohlen wird. Anhand einer Dialysiermembran, deren Durchlässigkeitsgrenze bei einem Molekulargewicht unter 5.000 liegt, kann man im mikrobiologischen Test Stoffe mit niedrigerem Molekulargewicht von den Lysozymen trennen. Zu diesem Zweck gossen die Autoren eine mehrmals gewässerte und auf die Petrischalen zugeschnittene Membran senkrecht stehend in den Bac. calidolactis-Agar ein und trugen das Probematerial unmittelbar an der Folie auf. TERPLAN (1972) erprobte diese Methode mit Fleisch und Milch und empfiehlt sich auch für Eiklar-Untersuchungen.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I MATERIAL UND METHODE

1. Testkeime

a) Herstellung der Keimsuspension mit Sarc. lutea

Als Testkeim diente Sarc. lutea ATCC 9341, der auf einem Schrägagar (Standard I Nähragar-Merck) gehalten und einmal wöchentlich überimpft wurde. Zur Herstellung der Keimsuspension wurde Sarc. lutea mit einer im Brutschrank angewärmten Nähr-Bouillon überspült und das Testkeimgemisch im Eppendorf-Photometer mit Filter Hg 578 mm auf eine 10%ige Lichttransmission eingestellt.

b) Herstellung der Sporensuspension mit Bac. subtilis BGA

Die Herstellung der Bac. subtilis-Sporensuspension wurde gemäß den Arbeitsanleitungen des BGA (1971) durchgeführt. Der Testkeim wurde auf einen Standard II Nähragar (MERCK) überimpft und 10 Tage bei + 30°C bebrütet. Nach Abspülen der Keime mit steriler phys. NaCl-Lösung wurde die Suspension 10 Min. bei 3.000 U/min. zentrifugiert und das dabei entstandene Sediment mit steriler phys. NaCl-Lösung gewaschen und nochmals bei 3.000 U/min. in sterilen Röhrchen zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgegossen, das Sediment in steriler phys. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und 30 Min. auf 70°C erhitzt.

Mit Hilfe des KOCHSCHEN Plattengußverfahren wurde die Sporensuspension auf eine Dichte von 10^7 Sporen/ml eingestellt und im Kühlraum aufbewahrt.

c) Herstellung der Sporensuspension mit *Bac. cereus* ATCC 11778

Die *Bac. cereus*-Sporensuspension wurde nach dem gleichen Verfahren (siehe *Bac. subtilis*) mit *Bac. cereus* ATCC 1178 hergestellt. Sie wurde auf eine Dichte von 10^5 eingestellt.

2. Nährböden

a) Herstellung der *Sarc. lutea*-Agar-Platten

Jeweils 25,5 g Antibiotik-Medium II (DIFCO) wurde unter Schütteln mit 1.000 ml Aqua dest. gemischt, bis zur vollständigen Lösung erhitzt und für 15 Min. bei 121°C autoklaviert. Der noch heiße Agar wurde anschließend in 21 ml Portionen in Petrischalen eingefüllt. Während die Platten im Brutschrank trockneten, wurde einem den Vorschriften entsprechend vorbereiteten und im Wasserbad wieder auf 48°C abgekühlten Standard I Nähragar (MERCK) pro 100 ml 1 ml *Sarc. lutea*-Lösung zugefügt. Das Agar-Testkeimgemisch wurde auf die vorgewärmten Platten in Mengen von 4 ml gleichmäßig aufgetragen und die so vorbereiteten Petrischalen zum Erstarren in den Kühlschrank gestellt.

b) Herstellung des Nährbodens mit *Bac. subtilis* BGA

Unter Berücksichtigung der optimalen Aktivitäten einiger Antibiotika in Abhängigkeit vom p_H -Wert des Mediums wurde der *Bac. subtilis*-Test im Doppelansatz mit Agar p_H 6 und Agar p_H 8 durchgeführt. Zur Herstellung des Agars p_H 6 wurde das Antibiotik-Medium I (DIFCO), zur Herstellung des Nährbodens mit Agar p_H 8, der Standard II Agar (MERCK) verwendet. Nach Erhitzen und 15 Min. Autoklavieren auf 121°C wurden die Medien auf ca. 50°C abgekühlt und mit Hilfe von 1 n HCl bzw. 1 n NaOH auf einen p_H von 6 bzw. 8 eingestellt. Sodann erfolgt der Zusatz der Sporensuspension, je 500 ml 50°C warmes Nährmedium wurde 0,5 ml einer *Bac. subtilis* Suspension zugegeben. Unter leichtem Schwenken des Erlmeyerkolbens wurden die Sporen untergemischt.

c) Herstellung des Nährbodens mit *Bac. cereus* ATCC 11778

25,5 g Antibiotik-Medium II (DIFCO) wurde in 1.000 ml Aqua dest. gelöst, autoklaviert und der Agar mit 1 n NaOH auf einen p_H von 5,8 eingestellt. Anschließend wurde pro 100 ml (auf 50°C abgekühltes) Antibiotik-Medium 1 ml einer *Bac. cereus* Suspension hinzugegeben.

3. Ausgießen, Vordiffusion und Bebrüten der Agar-Keim-Gemische

- a) Agar-Medium mit *Sarc. lutea*: Das Ausgießen des Nährbodens mit *Sarc. lutea* wurde bereits im Kapitel "Herstellung" beschrieben. Nach 2-stündiger Vordiffusion bei Zimmertemperatur wurden die mit Ei-Material versehenen Petrischalen 18 Std. lang bei + 37°C bebrütet. Die Hemmzonen wurden am folgenden Tag mit einem Zirkel ausgemessen.
- b) Agar-Medium mit *Bac. subtilis* BGA: Das Ausgießen der sporenhaltigen Nährmedien erfolgte auf einer völlig waagerechten Tischplatte. Speziell angefertigte Kunststoffrahmen mit einem Innenmaß von 19 x 19 cm wurden auf eine plangeschliffene Glasplatte gelegt und mit 80 ml Agar-Sporengemisch beschickt. Nach dem Abflammen wurden die Platten für ca. 1/2 Stunde mit sterilem Filterpapier und anschließend mit einer Glasscheibe abgedeckt. Die mit Untersuchungsmaterial beschickten Platten wurden zur Vordiffusion 1 Stunde bei + 4°C aufbewahrt und anschließend 18 Stunden lang bei + 27°C bebrütet. Die Hemmhöfe wurden mit einem Zirkel ausgemessen.
- c) Agar-Medium mit *Bac. cereus*: Das Ausgießen, die Vordiffusion und das Bebrüten der *Bac. cereus*-Nährböden erfolgt in gleicher Weise wie *Bac. subtilis*.

4. Standardlösung

a) Herstellung der Chloramphenicol-Standard-Lösung

Zur Herstellung der Chloramphenicol-Standard-Lösung wurde 1 g reines Chloramphenicol-Succinat in 50 ml Propylenglycol gelöst und davon 5 ml auf 1.000 ml Phosphatpuffer p_H 6 (2,0 g K_2HPO_4 + 8,0 g KH_2PO_4 auf 1.000 ml Aqua dest.) gegeben. Diese Stammlösung mit 100 mcg/ml wurde mit Puffer p_H 6 auf Konzentrationen von 20, 10, 5, 3, 2 mcg/ml verdünnt.

b) Herstellung der Penicillin-, CTC-, Streptomycin- und Erythromycin-Standard-Lösung

Zur Herstellung dieser Standardlösungen wurden 100 mg CTC-Hydrochlorid, 100 mg Procain-Penicillin G, 100 mg Dihydrostreptomycinsulfat und 100 mg Erythromycin auf einer Analysenwaage abgewogen und mit 1.000 ml Phosphatpuffer p_H 6 bzw. p_H 7,8 gemischt. Die Bereitung des Phosphatpuffers p_H 7,8 wurde folgendermaßen vorgenommen:

85 ml Lösung I (9,078 g KH_2PO_4 SÖRENSEN
auf 1 l Aqua dest.)
+ 915 ml Lösung II (11,1876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
SÖRENSEN auf 1 l Aqua dest.)

ergeben 1.000 ml Phosphatpuffer p_H 7,8.

Entsprechend ihres p_H -Optimums wurden Penicillin und CTC in Puffer p_H 6, Streptomycin und Erythromycin in Puffer p_H 7,8 gelöst. Mit Hilfe dieser

Ausgangslösungen wurden zur Erstellung von Standardwerten Eiweiß bzw. Eigelb und Antibiotikallösungen im Verhältnis 1 : 2 gemischt und für jedes Antibiotikum in Abhängigkeit von der untersten Nachweisgrenze unterschiedliche Konzentrationen (mcg/ml) gewählt.

Penicillin : 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03,
0,01, 0,007

C T C : 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03,
0,01

Streptomycin : 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3
0,1

Erythromycin : 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,2, 0,6

5. Untersuchungstechniken

a) Blättchentest

Für die Durchführung des Blättchentests wurden autoklavierte Testblättchen (SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 22) mit einem Durchmesser von 9 mm mittels einer Pinzette unter leichtem Andrücken auf den Agar aufgelegt. Die Beschickung der Blättchen mit der Testflüssigkeit erfolgte mit Hilfe von Mikropipetten, deren Fassungsvermögen 0,025 bzw. 0,05 ml betragen.

b) Agar - Lochtest

Im Agar-Lochtest wurden mit Hilfe eines Korkbohrers Agar-Scheiben ausgestanzt. Die Agar-Löcher hatten ein Fassungsvermögen von 0,2 ml. Je nach Konsistenz der zu untersuchenden Lösung wurde die Flüssigkeit mit der Pipette oder mit einer für kleine Mengen geeichten Spritze eingefüllt. Die Ausmessung der Hemmhöfe erfolgte mit einem Zirkel. Die gefundenen Werte wurden auf ein Lineal übertragen.

6. Beurteilung des Hemmhofes

Zur möglichst genauen Beurteilung der Hemmzone wurde mit dem Zirkel der gesamte Hemmdurchmesser abgenommen und auf ein Lineal übertragen. Davon wurde der Agar-Loch- bzw. der Blättchendurchmesser abgezogen und der verbleibende Wert halbiert.

Eine Wachstumshemmung (WH) besteht dann, wenn in diesem Bereich ein deutlich reduziertes Keimwachstum zu erkennen ist.

7. Technik der Eiuntersuchung

- a) Die zum Zweck der p_H -Wert-Messung am Versuchstag entnommenen Eier wurden angebohrt und das Eiweiß bzw. der Dotter mit einer sterilen Spritze entnommen. Die Bohrlöcher in der Eischale wurden mit Paraffin verschlossen und die Eier entweder im Kühlraum oder bei Zimmertemperatur gelagert. Die p_H -Wert-Messung wurde mit einem elektrischen p_H -Meter (Fa. Püsl) durchgeführt.
- b) Die während des Fütterungsversuchs gelegten Eier wurden täglich einmal abgenommen und bis zur Untersuchung im Kühlraum bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Eischalen wurden aufgeschlagen und die Eier auf einem perforierten Plastikhöcker, wie er in der Praxis verwendet wird, in Eigelb und Eiweiß getrennt. Es wurde darauf geachtet, daß das Eiklar vollständig abtropfte. Um die letzten Eiweißreste zu beseitigen, wurde die Dotterhaut mit sterilem Zellstoff abgetupft. Zum Öffnen der Dotterkugel wurde die Haut mit einer Pinzette abgehoben und mit einer Schere eingeschnitten. Anschließend wurde der Dotter mit dem Konus einer sterilen Spritze entnommen. Das Eiklar wurde in einer Petrischale aufgefangen und nach Mischung weiter verwendet.

Bei der Untersuchungs-Methode des Eiklars nach SCHELLHAAS (1973) wurde das Eiweiß auf die oben beschriebene Art gewonnen und im Ultraturax homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend 15. Min. lang bei $+ 70^{\circ}\text{C}$ im

Wasserbad erhitzt und die abgekühlte Flüssigkeit im Agar-Lochtest untersucht.

Das Eimaterial wurde in Abhängigkeit vom jeweils optimalen p_H -Wert des Antibiotikums mit Puffer p_H 6 bzw. p_H 7,8 im Verhältnis 1 : 2 verdünnt.

8. Versuchstiere und Fütterung

Für die Versuche standen 2 Jahre alte Weiße-Leghorn-Kreuzungen zur Verfügung. Die Hennen wurden teilweise in Einzelkäfigen, teilweise auf dem Boden gehalten. Alle erhielten während des Versuchs Legehennen-Alleinmehl L/II all-mash nach DLG-Standard. Für Antibiotika-Fütterungsversuche wurde das Antibiotikum in einem Elektro-Mikro-Mischer mit dem Futter gemischt und den Hennen zur freien Aufnahme verabreicht.

II ERGEBNISSE

1. Vergleichender Vorversuch mit Blättchentest und Agar-Lochtest zum Hemmstoff-Nachweis im Ei

Dieser Vorversuch wurde mit *Sarc. lutea* und Chloramphenicol durchgeführt, da die Sensibilität dieses Keims gegen Chloramphenicol relativ groß ist.

a) Blättchentest

Chloramphenicol-Standard-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden mit Mikropipetten auf Testblättchen, Durchmesser 9 mm (SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 22) in Mengen von 0,025 und 0,05 ml aufgetragen und die Hemmhofradien im Agar-Diffusionstest mit *Sarc. lutea* ausgemessen.

Tabelle 2: Chloramphenicol-Standard-Lösung

Konzentration in mcg/ml	aufgetragene Menge in ml	
	0,025 ml	0,05 ml
2	-	-
3	-	-
5	-	-
10	-	-
20	-	-
100	2 mm	3 mm

mm = Größe der Hemmzone

- = keine Hemmung des Keimwachstums

3 Teile Eiklar bzw. Eigelb wurden mit einem Teil Chloramphenicol-Lösung homogenisiert und auf die Filterblättchen 0,025, 0,05 und 0,1 ml dieser Suspension pipettiert. Außerdem wurden Blättchen in die Lösung eingetaucht, um eine optimale Aufnahme der Lösung zu erreichen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Chloramphenicol-Eiklargemisch

Konzentration in mcg/ml	aufgetragene Menge in ml Blättchen			
	0,025 ml	0,05 ml	0,1 ml	eingetaucht
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
5	-	-	-	+
10	-	+	+	+
20	+	2,0 mm	2,5 mm	3,0 mm

mm = Größe der Hemmhofradien

+ = Wachstumshemmung

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Tabelle 4: Chloramphenicol-Eigelb-Gemisch

Konzentration in mcg/ml	aufgetragene Menge in ml			Blättchen
	0,025 ml	0,05 ml	0,1 ml	eingetacht
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
5	-	-	-	+
10	-	-	-	+
20	-	-	-	+

+ = Wachstumshemmung

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Ergebnis: Mit zunehmender Menge, mit der das Filterblättchen beschickt wurde, traten in niedrigen Konzentrationen Wachstumshemmungen auf.

Im Chloramphenicol-Eiklar-Gemisch fallen schon bei relativ geringen Antibiotikum-Konzentrationen Wachstumshemmungen auf.

Bei der Chloramphenicol-Eigelbmischung werden Wachstumshemmungen nur beobachtet, wenn Testblättchen in die Lösung eingetaucht werden, d.h. also, wenn sie mit noch größeren Mengen als 0,1 ml beschickt werden.

b) Agar-Lochtest

Anstelle der Verwendung von Testblättchen wurde bei diesem Versuch mit dem Agar-Lochtest gearbeitet. Als Testkeim diente *Sarc. lutea*.

Unter Verwendung von fallenden Verdünnungen der Chloramphenicol-Lösungen entsprechend Versuch a) und der dort gewählten Mischungsverhältnisse mit Eiklar und Eigelb wurden die in Tabelle 5 zusammengestellten Werte erhalten.

Tabelle 5: Vergleich zwischen Chloramphenicol-
Standard mit Chloramphenicol-Eiklar
und -Dotter-Gemisch

Konzentration in mcg/ml	Hemmzonen in mm		
	Chloramph.- Lösung	Chloramphen.- Eiklar-Gem.	Chloramph.- Dotter-Gem.
2	-	+	-
3	-	+	-
5	3	3	3
10	5	5	5
20	6	7	6

+ = Wachstumshemmung

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Ergebnis: Bei gleichen Konzentrationen treten im Agar-Lochtest größere Hemmzonen auf als beim Blättchentest. Die Hemmzonen stimmen überein bei Verwendung reiner Chloramphenicol- und Chloramphenicol-Eiklar bzw. Chloramphenicol-Eigelbmischungen. Aus diesen Erwägungen heraus wurde dem Agar-Lochtest im weiteren Versuchsverlauf der Vorzug gegeben.

2. Physikalische Einflüsse auf die Hemmhofgrößen im Agar - Lochtest

a) Untersuchungen über die Diffusionsge- schwindigkeit

Um die Frage nach der zweckmäßigsten Ver-
dünnung und damit nach der größtmöglichen
Diffusion eines Antibiotikums zu klären,
wurde eine Eiweiß-, Eigelb-Antibiotika-
Lösung hergestellt und mit unterschiedlichen
Puffermengen derart versetzt, daß stets eine
Endkonzentration von 5 mcg Antibiotikum/ml
Flüssigkeit vorhanden war. Folgende Ei-Anti-
biotika-Verdünnungsverhältnisse wurden er-
probt:

1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5. Als Ausgangs-
lösung dienten ein Chloramphenicol- bzw. ein
Streptomycin-Eigelb und Eiweiß-Gemisch. Ver-
gleichsweise wurde ein Antibiotikum-Puffer-
Gemisch aufgetragen. Die Versuche wurden mit
Sarc. lutea und Bac. subtilis durchgeführt.
Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 - 11
dargestellt .

Chloramphenicol - Ei - Gemisch

Tabelle 6: Nährboden mit Sarc. lutea

Verdünnungs- verhältnis	Konz. mcg/ml	Hemmzonen in mm		
		Chloramph.- Puffer-Gem.	Chloramph.- Eiklar-Gem.	Chloramph.- Dotter-Gem.
1 : 2	5	2,5	2,0	+
1 : 3	5	2,5	2,0	+
1 : 4	5	2,5	2,0	+
1 : 5	5	2,5	2,0	+

+ = Wachstumshemmung

Tabelle 7: Nährboden mit Bac. subtilis p_H 6

Verdünnungs- verhältnis	Konz. mcg/ml	Hemmzonen in mm		
		Chloramph.- Puffer-Gem.	Chloramph.- Eiklar-Gem.	Chloramph.- Dotter-Gem.
1 : 2	5	3,5	5,0	-
1 : 3	5	3,5	5,0	+
1 : 4	5	3,5	5,0	+
1 : 5	5	3,5	5,0	+

+ = Wachstumshemmung

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Tabelle 8: Nährboden mit Bac. subtilis p_H 8

Verdünnungs- verhältnis	Konz. mcg/ml	Hemmzonen in mm		
		Chloramph.- Puffer-Gem.	Chloramph.- Eiklar-Gem.	Chloramph.- Dotter-Gem.
1 : 2	5	7,0	5,0	+
1 : 3	5	7,0	5,0	+
1 : 4	5	7,0	5,0	+
1 : 5	5	7,0	5,0	+

+ = Wachstumshemmung

Streptomycin - Ei - Gemisch

Tabelle 9: Nährboden mit Sarc. lutea

Hemmzonen in mm				
Verdünnungs- verhältnis	Konz. mcg/ml	Streptomyc.- Puffer-Gem.	Streptomyc.- Eiklar-Gem.	Streptomyc.- Dotter-Gem.
1 : 2	5	3,0	2,0	-
1 : 3	5	3,0	2,0	-
1 : 4	5	3,0	2,0	+
1 : 5	5	3,0	2,0	+

+ = Wachstumshehmung

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Tabelle 10: Nährboden mit Bac. subtilis p_H 6

Hemmzonen in mm				
Verdünnungs- verhältnis	Konz. mcg/ml	Streptomyc.- Puffer-Gem.	Streptomyc.- Eiklar-Gem.	Streptomyc.- Dotter-Gem.
1 : 2	5	8,0	8,0	5,0
1 : 3	5	8,0	8,0	5,0
1 : 4	5	8,0	8,0	6,0
1 : 5	5	8,0	8,0	6,0

Tabelle 11: Nährboden mit Bac. subtilis p_H 8

Verdünnungs- verhältnis	Konz. mcg/ml	Hemmzonen in mm		
		Streptomyc.- Puffer-Gem.	Streptomyc.- Eiklar-Gem.	Streptomyc.- Dotter-Gem.
1 : 2	5	10,0	10,0	7,0
1 : 3	5	10,0	10,0	7,0
1 : 4	5	10,0	10,0	7,0
1 : 5	5	10,0	10,0	8,0

Ergebnis: Während die Hemmzonen mit Antibiotika-Puffer bzw. Antibiotika-Eiweißgemisch im jeweiligen Ansatz unabhängig vom Verdünnungsverhältnis gleich groß bleiben, werden die Hemmhöfe der Dotter-Antibiotikalösung mit stärkerer Verdünnung größer. Da diese Differenz relativ gering ist, wurde für die weiteren Antibiotika-Nachweise im Ei ein Dotter- bzw. Eiweiß-Verdünnungsverhältnis von 1 : 2 gewählt.

b) Untersuchung zur Hitzestabilität einiger
Antibiotika

Da die Hemmhofgröße im Agar-Lochtest wesentlich von der mikrobiologischen Aktivität der Antibiotika abhängig ist, stellt sich die Frage, inwieweit einige Antibiotika nach der Erhitzung Einbußen hinsichtlich ihrer Hemmwirkung erfahren. Diese Fragestellung ergibt sich besonders aus Überlegungen zur Inhibierung der Lysozymaktivität durch Hitzeeinwirkung.

Um dies zu prüfen, wurden verschiedene Antibiotika-Lösungen im Agar-Lochtest mit *Bac. subtilis* BGA (Agar p_H 6) sowohl 15 Minuten auf $70^\circ C$ erhitzt (Methode nach SCHELLHAAS) als auch unerhitzt aufgetragen. Dabei ergaben sich folgende Hemmradien in mm:

Tabelle 12: Antibiotika - Lösungen

Antibiotikum	Konz. mcg/ml	Hemmzonen in mm	
		unerhitzt	erhitzt
Chloramphenicol	10	4,0	4,0
Penicillin	0,5	12,0	11,0
Chlortetracyclin	10	16,0	15,0
Streptomycin	10	7,0	7,0
Erythromycin	10	4,0	2,5

Ergebnis: Bei Penicillin, Chlortetracyclin und Erythromycin wurden nach Erwärmung der Antibiotika-Lösung kleinere, bei Chloramphenicol und Streptomycin unverändert große Hemmhöfe gemessen.

Vergleich zwischen erhitztem und unerhitztem
Antibiotika - Eiweiß - Gemisch

Neben der Hemmhofbeeinflussung durch Hitzeaktivierung einiger Antibiotika (Tabelle 12) wurde ein Vergleich zwischen erhitztem und unerhitztem Antibiotikum-Eiweiß-Gemisch durchgeführt.

Das im Ultraturax homogenisierte Eiweiß wurde im Verhältnis 1 : 1 mit verschiedenen Antibiotika-Lösungen gemischt und unerhitzt bzw. nach 15-minütiger Erwärmung auf 70°C im Lochtest angesetzt.

Tabelle 13: Antibiotika-Eiweiß-Gemisch

Antibiotikum- Eiklar-Gem.	Konz. mcg/ml	Hemmzonen in mm	
		unerhitzt	erhitzt
Chloramphenicol	10	4,0	4,0
Penicillin	0,5	10,0	9,0
Chlortetracyclin	10	12,0	9,0
Streptomycin	10	7,0	7,0
Erythromycin	10	4,0	2,5

Ergebnis: Penicillin-, Chlortetracyclin- und Erythromycin-Eiweißgemisch zeigten nach Erhitzung auf 70°C geringere mikrobiologische Aktivität als die nicht erhitzten Gemische.

c) Untersuchungen über p_H -Wert-Verschiebungen im Ei

Wegen der aus der Literatur bekannten p_H -abhängigen mikrobiologischen Aktivität der Antibiotika wurden p_H -Wert-Messungen im Eiklar und Eigelb in Abhängigkeit von verschiedenen Temperaturen und der Lagerungsdauer durchgeführt.

Die unmittelbar nach dem Legen entnommenen Eier wurden angebohrt und das Eiweiß bzw. der Dotter mit einer sterilen Spritze entnommen. Die Bohrlöcher in der Eischale wurden mit Paraffin verschlossen und die Eier entweder bei + 4°C, + 18°C bzw. + 37°C gelagert. Das Eiklar wurde jeweils 1, 3, 5, 25, 27 und 29 Stunden nach dem Legen entnommen und die p_H - Werte gemessen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Durchschnittliche p_H -Werte im Eiklar aus je 4 Eiern nach Lagerung der Eier bei + 4°C, + 18°C und 37°C über 1 - 29 Stunden

Std. n. Legen	p_H -Wert d. Eiklars nach Lagerungstemperaturen von		
	4°C	18°C	37°C
1	7,8	7,8	8,1
3	7,8	7,8	8,5
5	7,8	8,0	8,6
25	7,8	8,7	9,2
27	-	8,7	9,3
29	-	8,9	9,3

- = nicht untersucht

4 Eier wurden ca. 4 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert und auf ihren p_H -Wert im Eiklar untersucht. 4 weitere Eier wurden im Vergleich dazu 6 Tage lang im Kühlschrank gelagert und dann erstmalig zum Zweck der p_H -Wert-Messung im Eiklar geöffnet (Tabelle 15).

Tabelle 15: p_H - Durchschnittswerte im Eiklar

Durchschnittliche p_H - Werte	
ca. 4 Std. n. Legen	6 Tage n. Legen
8,2	9,7

Die Eier von 12 Versuchstieren wurden bei Zimmer-
temperatur gelagert und sowohl Eiklar als auch
Eigelb in gleichen zeitlichen Abständen auf
 p_H - Wert - Verschiebungen untersucht (Tabelle
16 und 17)

Tabelle 16: p_{H} -Wertverschiebung im Eiklar

Std. nach		Huhn Nr.										
Legen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	7,8	7,8	7,7	8,2	8,2	8,0	8,0	7,9	8,1	8,1	8,0	8,1
24	-	8,0	8,8	9,2	9,1	9,2	8,9	9,1	9,2	9,5	9,1	9,5
168	9,7	-	-	9,6	9,7	9,6	-	9,7	-	9,3	9,6	9,6

- = nicht untersucht

Tabelle 17: PH - Wertverschiebung im Eigelb

Stunden nach Legen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Huhn Nr.											
2	5,8	5,9	5,9	5,9	5,9	6,0	6,0	5,9	5,9	5,8	6,0	5,8	5,9
24	6,0	6,0	5,9	5,9	5,9	5,9	6,2	6,0	6,2	5,9	6,0	5,8	5,9
168	6,1	6,1	6,0	6,2	6,2	5,9	6,0	-	6,0	6,0	5,9	6,0	6,0

- = nicht untersucht

Ergebnis: Bei längerer Lagerung von Eiklar ergab sich in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur bzw. -Dauer, eine Erhöhung des p_H -Wertes im alkalischen Bereich. Während sich die p_H -Werte des Eiklars insbesondere bei hohen Lagerungstemperaturen schnell veränderten, wurden im Dotter nach Lagerung bei Zimmertemperatur nur geringe p_H -Wertanstiege von 5,8 bis 6,2 beobachtet.

3. Chemische Einflüsse auf die Hemmhofgrößen im Agar-Lochtest

a) Größenbestimmung der lysozymbedingten Hemmhöfe bei den einzelnen Testkeimen

Zur Ermittlung lysozymbedingter Hemmhofgrößen wurden 0,2 ml unverdünntes Eiklar (EK) bzw. Eigelb (D) aus Eiern antibiotikafrei gefütterter Versuchshennen auf die mit unterschiedlichen Testkeimen versehenen Platten aufgetragen und nach 18-stündiger Bebrütung abgelesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 vergleichend dargestellt.

Ergebnis: Aufgrund der Untersuchung von Eiern antibiotikumfrei gefütterter Versuchshühner wurde festgestellt, daß die Lysozyme des Eiklars im Agar-Lochtest mit *Sarc. lutea* Hemmzonen bis 2,5 mm, mit *Bac. subtilis* p_H 6 bis zu 2,5 mm und mit *Bac. subtilis* p_H 8 bis zu 3,0 mm verursachten. *Bac. cereus* zeigte auf Grund der Lysozymwirkung bei der Mehrzahl der untersuchten Eier geringe Wachstumshemmungen. Parallel laufende Versuche mit Dotter ergaben keinen Hinweis auf unspezifische Hemmungen des Testkeimwachstums (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Bestimmung der unspezifischen Hemmhöfe an Eiern von antibiotikumfrei gefütterten Hennen

Huhn		Hemmzonen in mm						
Nr.	Sarc. lutea		Bac. sub-tilis p _H 6		Bac. sub-tilis p _H 8		Bac. cereus	
	EK	D	EK	D	EK	D	EK	D
1	2,0	-	2,0	-	2,5	-	+	-
2	1,5	-	2,0	-	3,0	-	-	-
3	2,5	-	2,5	-	2,5	-	+	-
4	2,0	-	1,5	-	2,5	-	-	-
5	2,0	-	2,0	-	1,5	-	+	-
6	2,0	-	2,0	-	3,0	-	+	-
7	2,0	-	2,5	-	3,0	-	+	-
8	2,5	-	1,5	-	2,5	-	+	-
9	2,5	-	2,0	-	2,5	-	+	-
10	2,0	-	1,5	-	2,5	-	+	-
11	2,5	-	1,5	-	2,0	-	+	-
12	2,5	-	2,0	-	2,5	-	+	-

+ = Wachstumshemmung

- = keine Hemmung des Keimwachstums

b) Versuche zur Inhibierung der Lysozymwirkung

1) Verhinderung der Lysozymwirkung durch
 p_H - Wertverschiebung im Eiklar

Da nach MEYER et al. (1936) die Lysozymwirkung durch NaOH-Zusatz zum Eiklar-Gemisch erheblich herabgesetzt werden kann, war die dadurch bedingte p_H -Werterhöhung in ihrer Auswirkung auf Testkeim und Nährboden zu überprüfen.

Zunächst wurde physiologische NaCl so mit NaOH versetzt, daß sich p_H -Werte von 7, 8, 9, 10 und 11 ergaben. Die Wirkung dieser NaCl-Lösungen wurden im Agar-Lochtest mit *Sarc. lutea* untersucht.

Tabelle 19: Einfluß des p_H -Wertes auf das Wachstum von *Sarc. lutea*

p_H der Phys. NaCl-Lösung	Hemmzonen in mm
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Ergebnis: Das Wachstum von *Sarc. lutea* blieb durch die p_H -Wertverschiebungen zum alkalischen Bereich unbeeinflusst.

In einem weiteren Versuch wurde das Eiklar frischer Eier tropfenweise mit 0,01 n NaOH versetzt und auf p_H -Werte von 8, 9, 10 und 11 eingestellt. Nach 10-minütiger Einwirkung der NaOH bei Zimmertemperatur wurde das Untersuchungsmaterial im Agar-Lochtest angesetzt. Zum Vergleich wurde unbehandeltes Eiklar auf die *Sarc. lutea* Testplatten aufgetragen.

Tabelle 20: Hemmhofmeßung nach p_H -Wertver-
änderung im Eiklar

p_H - Wert	Hemmzonen in mm	
	behandelt	unbehandelt
8	2,0	2,0
9	2,0	2,0
10	2,0	2,0
11	2,0	2,0

Ergebnis: Unterschiedliche p_H -Werte im Eiklar führen zu keiner Inaktivierung der Lysozyme. Sowohl beim unbehandelten Eiklar als auch beim Eiklar mit stark erhöhten p_H -Werten wurden gleich große Hemmhöfe gemessen.

2) Verhinderung der Lysozymwirkung durch
Erhitzen des Eiklars

Eiklar und Eigelb wurden beim Aufschlagen getrennt und das Eiklar im Ultraturax homogenisiert. Das Eiweiß-Homogenisat wurde in sterile Glasröhrchen eingefüllt und im Wasserbad bei 70°C 15 Minuten lang erhitzt. Die sauermilch-ähnliche Masse wurde im Agar-Lochtest mit *Bac. subtilis* BGA (Agar p_H 6) untersucht. Ein Teil des Eiklars der zu diesem Versuch verwandten Eier wurde im Vergleich dazu 15 Minuten lang lediglich auf 60°C erhitzt. Zusätzlich wurde unerhitztes Eiweiß-Homogenisat untersucht.

Tabelle 21: Temperaturabhängige Hemmzonen des
Eiklars

Ei Nr.	Hemmzonen des Eiklars in mm		
	unerhitzt auf 60°C	erhitzt auf 70°C	erhitzt
1	3,0	3,0	-
2	2,0	2,0	-
3	2,5	2,5	-
4	3,0	3,0	-
5	3,0	3,0	-

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Ergebnis: Bei den unerhitzten bzw. auf 60°C erhitzten Proben war die Lysozymaktivität nicht eingeschränkt. Die auf 70°C erwärmten Proben zeigten keine Hemmwirkung.

3) Ausschalten der Lysozymwirkung mit Hilfe einer Dialysiermembran

Eine Dialysiermembran (KALLE) mit einer Porengröße von 20 - 80 Å und einer Durchlässigkeit bis zu einem Molekulargewicht von 5.000 wurde so zugeschnitten, daß sie den Boden der halben Nährbodenschale bedeckte und in der Mitte der Schale im Winkel von 90° senkrecht nach oben über das Medium stand.

Vor Verwendung wurde die Folie innerhalb 24 Stunden mehrmals mit 35°C erwärmten Aqua dest. gewässert. Vor Einlegen der Folie in die Nährbodenschalen wurde das Wasser leicht abgeschüttelt und die Membran bis zum Erstarren des eingegossenen Nährmediums an den Wänden der Schalen fixiert.

Die Agar-Löcher wurden in gleichmäßigen Abständen entlang der Folie ausgestanzt.

Zur Erprobung der Dialysiermembran wurde Eiweiß ohne Antibiotikumszusatz in die Agar-Löcher einpipettiert und die Hemmhöfe vor bzw. nach Folienpassage gemessen.

Außerdem wurden Chloramphenicol-Eiweiß-Lösungen mit Konzentrationen von 2, 3, 5, 10 und 20 mcg/ml im Agar-Lochtestverfahren mit *Sarc. lutea* verwendet (Tabelle 22).

Tabelle 22: Hemmzonenmeßung vor und nach
Folienpassage

Chloramph.- Konz. in mcg/ml	Eiklar m. Antib.		Eiklar o. Antib.	
	Hemmzone in mm		Hemmzone in mm	
	vor	nach	vor	nach
	Folienpassage		Folienpassage	
2	3,0	-	3,0	-
3	2,5	-	2,5	-
5	3,0	3,0	2,0	-
10	5,0	5,0		
20	7,0	7,0		

- = keine Hemmung des Keimwachstums

Ergebnis: Vor und nach Folienpassage ergaben Chloramphenicol-Konzentrationen von 5 mcg/ml und mehr gleich große Hemmradien. Eiklar ohne Antibiotikum-Zumischung ergab vor der Folienpassage Hemmhöfe zwischen 2 und 3 mm. Diese Hemmhöfe traten nach der Folienpassage des Eiklars nicht mehr auf.

Diese günstigen Ergebnisse wurden jedoch in weiteren orientierenden Versuchen mit anderen Folienlieferungen der gleichen und anderen Herstellungsnummern nicht erzielt. Siehe Beispiel Tabelle 22a.

Tabelle 22 a:

Ei Nr.	Eiklar o. Antib.	
	Hemmzone in mm	
	vor	nach
	Folienpassage	
1	3,0	3,0
2	2,0	2,0
3	2,5	2,5

4. Nachweis von Chloramphenicol, Penicillin, Chlortetracyclin, Streptomycin und Erythromycin mit Bac. subtilis BGA (Agar p_H 6 und 8), im Tierversuch mit Bodenhaltung
-

Versuchsanordnung:

In diesem Versuch wurden jeweils 15 Versuchshühner (Bodenhaltung) 5 Tage lang unter gleichen Versuchsbedingungen mit

2,0 g Chloramphenicol-Succinat je kg Futter
3,0 g Procain-Penicillin - G je kg Futter
3,0 g Chlortetracyclin-Hydrochlorid je kg Futter
3,0 g Dihydrostreptomycin-Sulfat je kg Futter
3,0 g Erythromycin-Thiocyanat je kg Futter

im Legehennen-Alleinmehl gefüttert.

Die Eier wurden täglich einmal abgenommen und bis zur Untersuchung im Kühlraum bei + 4°C gelagert. Der mikrobiologische Test wurde mit Bac. subtilis BGA (Agar p_H 6 und 8) durchgeführt, um den in der Fleischuntersuchung routinemäßig angewandten Testkeim für Rückstandsbestimmungen im Ei zu testen. Die Entnahme des Eiklars und Eigelbs erfolgt in der in "Material und Methode" beschriebenen Art. Bei der Untersuchung wurden Eiweiß und Eigelb mit dem jeweils optimalen Phosphatpuffer

Chloramphenicol	p_H 6
Penicillin	p_H 6
Chlortetracyclin	p_H 6
Streptomycin	p_H 7,8
Erythromycin	p_H 7,8

im Verhältnis 1 : 2 gemischt und die Dauer der Antibiotikum-Ausscheidung mittels der Hemmzonen gemessen.

Da Hemmzonen im Eiklar unter 3,0 mm vielfach unspezifischer Natur sind, wurden in den folgenden Tabellen beim Eiweiß erst Hemmzonen über 3,0 mm registriert.

Die Gesamtzahl der Eier, die Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen im Eiklar bzw. im Dotter ergaben, sind in den Tabellen notiert.

Die unter EK = Eiklar bzw. D = Dotter aufgeführten Werte beziehen sich auf die jeweils größte Hemmzone unter den Ergebnissen.

Eine Wachstumshemmung wird in den folgenden Tabellen mit + bezeichnet.

Der erste Versuchstag ist jeweils der erste Fütterungstag.

- a) Verabreichung von 2,0 g Chloramphenicol
pro kg Futter
-

Tabelle 23: (siehe Seite 62)

Ergebnis: Bei einer Dosierung von 2,0 g Chloramphenicol pro kg Futter über 5 Tage an 15 Hennen konnten in der Zeit vom 1. - 7. Tag nach Absetzen des Chloramphenicols mit Bac. subtilis p_H 6 Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen im Dotter gemessen werden.

Auf Agar p_H 8 wurden nur bis zum 6. Tag nach dem Absetzen Hemmzonen und Wachstums-
hemmungen beobachtet.

Ein Chloramphenicol-Nachweis im Eiweiß gelang nicht.

- b) Verabreichung von 3,0 g Penicillin
pro kg Futter
-

Ergebnis: Nach 5-tägiger Verabreichung von 3,0 g Penicillin an 15 Tieren über das Futter konnten weder im Eiklar noch im Eigelb Hemmzonen gemessen werden.

Auf die tabellarische Darstellung wurde deshalb verzichtet.

Tabelle 23: Verabreichung von 2,0 g Chloramphenicol pro kg Futter

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmung			
		Bac. subtilis EX	Bac. subtilis P_H 6 D	Bac. subtilis P_H 8 EK	D
1	8				
2	6				
3	11				
4	9				
5	9				
6	9				1 3,0
7	8				2 +
8	13				8 1,0
9	6				6 +
10	9				6 +
11	8				2 +
12	6				
13	6				
14	9				
15	8				

c) Verabreichung von 3,0 g Chlortetracyclin
pro kg Futter

Tabelle 24:

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen Bac. subtilis p _H 6	
		EK	D
1	4		
2	6		
3	9		
4	3		
5	9		
6	8	2	1,0
7	6	1	+
8	6	3	1,0
9	9	2	+
10	6		
11	5		
12	8		
13	7		
14	9		
15	8		

Ergebnis: 15 Hennen erhielten 5 Tage lang 3,0 g Chlortetracyclin über das Futter. Bei Verwendung von Dotter wurden lediglich in der Zeit vom 1. - 4. Tag nach Absetzen des Antibiotikums Hemmzonen bzw. Wachstums-hemmungen mit Bac. subtilis p_H 6 gemessen. Im Eiklar wurden keine Hemmzonen gemessen. Da sich mit Bac. subtilis p_H 8 keine Hemmzonen zeigten, wurde auf die tabellarische Darstellung verzichtet.

d) Verabreichung von 3,0 g Streptomycin
pro kg Futter

Ergebnis: Bei einer Dosierung von 3,0 g Streptomycin pro kg Futter und 5-tägiger Verabreichung an 15 Hennen waren weder im Eiklar noch im Eigelb Antibiotikum-Nachweise mit Bac. subtilis p_H 6 und 8 möglich.

e) Verabreichung von 3,0 g Erythromycin
pro kg Futter

Tabelle 25: (siehe Seite 66)

Ergebnis: Bei einer Verabreichung von 3,0 g Erythromycin über 5 Tage an 15 Hennen, wurden sowohl im Dotter als auch im Eiweiß, positive Befunde erhoben.

Mit Bac. subtilis p_H 6 wurden vom 3. Fütterungstag bis zum 1. Tag nach Absetzen des Antibiotikums Hemmzonen im Eiklar gemessen.

Mit Bac. subtilis p_H 8 gelang der Hemmzonen-Nachweis im Eiklar ab 2. Fütterungstag bis 3 Tage nach Absetzen des Erythromycins .

Im Dotter konnten mit Bac. subtilis p_H 6 und 8 vom letzten Fütterungstag bis zum 10. Tag nach Entzug des Antibiotikums Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen ermittelt werden.

Tabelle 25: Verabreichung von 3,0 g Erythromycin pro kg Futter

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen		
		Bac. subtilis PH 6 EK	Bac. subtilis PH 8 EK	Bac. subtilis PH 8 D
1	6		3 8,0	
2	3		7 11,0	
3	8	8 6,0	4 9,0	
4	4			
5	8	4 3,5	8 8,0	3 5,0
6	4	2 5,0	4 7,0	3 10,0
7	3		3 6,0	2 7,0
8	6		5 7,0	6 9,0
9	5			5 10,0
10	6			5 10,0
11	5			5 10,0
12	4			4 7,0
13	4			4 7,0
14	6			4 6,5
15	6			2 7,0
16	5			

5. Nachweis von Chloramphenicol, Penicillin, Chlortetracyclin, Streptomycin und Erythromycin mit *Bac. subtilis* BGA (Agar p_H 6 und 8), *Bac. cereus* ATCC 11778 und *Sarc. lutea* ATCC 9341 im Tierversuch mit Käfighaltung
-

Versuchsanordnung:

In diesem Versuch wurden jeweils 5 Versuchshühner (Haltung in Einzelkäfigen) 5 Tage lang mit

Chloramphenicol-Succinat
Procain-Penicillin-G
Chlortetracyclin-Hydrochlorid
Dihydrostreptomycin-Sulfat
Erythromycin-Thiocyanat

unterschiedlicher Dosierung im Futter gefüttert. Es wurden jeweils zwei relativ hohe Fütterungsdosierungen als Modellversuche gewählt. Die Eier wurden täglich einmal abgenommen und bis zur Bearbeitung im Kühlraum bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Als Untersuchungsverfahren dienten der Agar-Lochtest mit *Bac. subtilis* BGA (Agar p_H 6 und 8), *Bac. cereus* ATCC 11778 und *Sarc. lutea* ATCC 9341 als Testkeim.

Eiweiß und Eigelb wurden nach der in "Material und Methode" beschriebenen Art entnommen und mit dem jeweiligen optimalen Phosphat-Puffer

Chloramphenicol	p _H 6
Penicillin	p _H 6
Chlortetracyclin	p _H 6
Streptomycin	p _H 7,8
Erythromycin	p _H 7,8

im Verhältnis 1 : 2 gemischt.

Da Hemmzonen im Eiklar unter 3,0 mm vielfach unspezifischer Natur sind, wurden in den folgenden Tabellen beim Eiweiß erst Hemmzonen über 3,0 mm registriert.

Die Gesamtzahl der Eier, die Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen im Eiklar bzw. im Dotter ergaben, sind in den Tabellen notiert.

Die unter EK = Eiklar bzw. D = Dotter aufgeführten Werte beziehen sich auf die jeweils größte Hemmzone unter den Ergebnissen.

Eine Wachstumshemmung wird in den folgenden Tabellen mit + bezeichnet.

Der erste Versuchstag ist jeweils der erste Fütterungstag.

Tabelle 26:

Versuchs- tag	Gesamt- zahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen			
		Sarc. lutea EK	Bac. subtilis EK	Bac. subtilis pH 6 D	Bac. subtilis pH 8 D EK
1	2				
2	3				
3	2				
4	2				
5	2		2 +	1 +	1 +
6	-				
7	2			1 3,5	1 4,0
8	2			2 5,0	2 4,0
9	2			2 4,0	2 5,0
10	2			1 4,0	1 4,0
11	-				
12	1			1 +	1 +
13	1				
14	2				
15					

Ergebnis: (zu Tabelle 26) Bei insgesamt 5-tägiger Verabreichung von 1,5 g Chloramphenicol je kg Futter, entsprechend 180 mg/Tier und Tag, war Chloramphenicol sowohl im Eiklar als auch im Eigelb nachweisbar. Der Nachweis im Eiklar war lediglich mit Bac. subtilis p_H 8 vom 5. Versuchstag bis 3 Tage nach dem Absetzen möglich.

Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen im Dotter waren vom letzten Fütterungstag bis 5 Tage nach Antibiotikum-Entzug mit Sarc. lutea nachweisbar.

Mit Bac. subtilis p_H 6 und 8 wurden ebenfalls vom letzten Fütterungstag bis 7 Tage nach Antibiotikum-Entzug Hemmzonen und Wachstumshemmungen im Dotter gemessen.

Mit Bac. cereus konnten weder im Eiklar noch im Eigelb positive Befunde erhoben werden. Auf ihre tabellarische Darstellung wurde deshalb verzichtet.

Tabelle 27:

Versuchs- tag	Gesamt- zahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen							
		Sarc. lutea		Bac. subtilis pH 6		Bac. subtilis pH 8		Bac. cereus	
		EK	D	EK	D	EK	D	EK	D
1	1								
2	3								
3	2								
4	2								
5	2		1	1,0	1	3,5		2	4,0
								1	4,0
6	-								
7	2		2	2,0	2	3,5		1	4,0
8	2		1	1,5	2	5,0		1	+
9	2		2	+	2	4,0			
10	2		2	+	1	4,0		1	4,0
11	-								
12	1		1	+	1	+		1	+
13	1								
14	2								
15	1								

Ergebnis: Bei einer Dosierung von 3,0 g Chloramphenicol pro kg Futter über 5 Tage, entsprechend 360 mg/Tier und Tag, wurden vom 4. Fütterungstag bis zum 3. Tag nach Absetzen des Chloramphenicols lediglich mit Bac. subtilis p_H 8 Hemmzonen im Eiklar gesehen.

Im Dotter konnten mit Sarc. lutea und Bac. subtilis p_H 6 und 8 in der Zeit vom 5. Fütterungstag bis 7 Tage nach Entzug des Chloramphenicols Hemmzonen und Wachstums-hemmungen gemessen werden.

Ein Chloramphenicol-Nachweis mit Bac. cereus gelang nur im Dotter und zwar vom 2. - 7.

Tag nach Antibiotikum-Entzug.(siehe Tab.27)

Verabreichung von 1,5 g Penicillin pro kg Futter

Ergebnis: Nach einer Verabreichung von 1,5 g Penicillin pro kg Futter über 5 Tage, entsprechend 180 mg/Tier und Tag, konnten mit den hier angewandten Methoden weder im Eiklar noch im Eigelb Hemmzonen gemessen werden. Auf eine tabellarische Darstellung wird deshalb insgesamt verzichtet.

Tabelle 28:

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen					
		Sarc. lutea EK	Sarc. lutea D	Bac. subtilis EK	Bac. subtilis pH D	Bac. subtilis pH D	Bac. subtilis pH D
1	-						
2	3						
3	3						
4	3						
5	3						
6	4		4 1,0		4 5,0	4 4,5	
7	2		1 +		1 +	1 4,0	
8	3		3 +			3 4,0	
9	4					1 +	
10	3						
11	3						
12	3						
13	4						
14	3						
15	3						

Ergebnis: Nach 5-tägiger Verabreichung von 3,0 g Penicillin pro kg Futter, entsprechend 360 mg/Tier und Tag, konnten lediglich im Dotter positive Befunde erhoben werden. Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen konnten im Dotter mit *Sarc. lutea* in der Zeit vom 1. - 3. Tag nach Entzug des Penicillins gemessen werden.

Mit *Ba c. subtilis* p_H 6 wurden lediglich am 1. und 2. Tag nach Absetzen des Penicillins Hemmzonen und Wachstumshemmungen im Eigelb ermittelt, mit *Bac. subtilis* p_H 8 vom 1. - 4. Tag nach Beendigung der Antibiotikum-Fütterung.

Ein Penicillin-Nachweis mit *Bac. cereus* war weder im Eiweiß noch im Dotter möglich. Auf die entsprechende tabellarische Darstellung wurde verzichtet. (siehe Tab.28)

Verabreichung von 1,5 g Chlortetracyclin
pro kg Futter

Tabelle 29:

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen Sac. cereus	
		EK	D
1	3		
2	2		
3	3		
4	4		
5	4		1 +
6	2		1 3,5
7	3		3 6,0
8	3		3 3,5
9	1		1 +
10	3		2 3,5
11	3		
12	3		1 +
13	3		
14	2		
15	4		

Ergebnis: Nach 5-tägiger Verabreichung von 1,5 g Chlortetracyclin je kg Futter, entsprechend 180 mg/Tier und Tag, konnte der Nachweis lediglich im Dotter geführt werden. Unter Verwendung von *Bac. cereus* war das Antibiotikum vom letzten Fütterungstag bis zum 7. Tag nach Absetzen des Futters nachzuweisen.

Mit *Sarc. lutea* und *Bac. subtilis* p_H 6 und 8 wurden weder im Dotter noch im Eiklar Rückstände beobachtet. Auf die entsprechende Darstellung wurde verzichtet.

Verabreichung von 3,0 g Chlortetracyclin
pro kg Futter

Tabelle 30:

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen Bac. cereus	
		EK	D
1	2		
2	1		
3	4		
4	3		
5	3	1	6,5
6	2	1	3,5
7	4	2	5,0
8	4	3	5,0
9	4	4	5,0
10	1	1	+
11	4	3	+
12	3		
13	3		
14	4		
15	3		

Ergebnis: Bei einer Verabreichung von 3,0 g Chlortetracyclin je kg Futter über 5 Tage, entsprechend 360 mg/Tier und Tag, konnten nur im Dotter Rückstände gemessen werden. Mit *Bac. cereus* als Testkeim wurden vom 5. Fütterungstag bis zum 6. Tag nach Antibiotikum-Entzug Hemmzonen bzw. Wachstums- hemmungen gemessen. Ein Chlortetracyclin-Nachweis im Ei mit den übrigen hier verwandten Testkeimen gelang nicht. Auf deren tabellarische Erfassung wurde verzichtet.

Verabreichung von 1,5 g Streptomycin
pro kg Futter

Ergebnis: Bei der Dosierung von 1,5 g Streptomycin pro kg Futter über 5 Tage, entsprechend 180 mg/Tier und Tag, konnten mit den hier verwandten Testkeimen weder im Eiklar noch im Dotter Hemmzonen nachgewiesen werden. Auf eine tabellarische Darstellung wurde insgesamt verzichtet.

Verabreichung von 3,0 g Streptomycin
pro kg Futter

Tabelle 31:

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen	
		Bac. subtilis p _H 8	
		EK	D
1	3		
2	2		
3	2		
4	3	2	4,0
5	2	1	4,0
6	2		
7	3		
8	2		
9	3		
10	3		
11	2		
12	2		
13	3		
14	3		
15	2		

Ergebnis: Nach 5-tägiger Fütterung von 3,0 g Streptomycin pro kg Legehennen-Alleinmehl, entsprechend 360 mg Streptomycin pro Tier und Tag, konnten Hemmzonen nur mit Bac. subtilis p_H 8 am 4. und 5. Versuchstag im Eiklar beobachtet werden. Auf weitere tabellarische Darstellungen wurde deshalb verzichtet.

Verabreichung von 1,5 g Erythromycin
pro kg Futter

Tabelle 32: (siehe Seite 81)

Ergebnis: Bei insgesamt 5-tägiger Verabreichung von 1,5 g Erythromycin je kg Futter, entsprechend 180 mg pro Tier und Tag, wurden sowohl mit Eigelb als auch mit Eiklar Hemmzonen gemessen.

Im Eiklar wurden mit Sarc. lutea und Bac. subtilis p_H 6 am 3. Fütterungstag und am 2. Tag nach Antibiotikum-Entzug Hemmzonen gemessen.

Mit Bac. subtilis p_H 8 wurden Hemmzonen im Eiklar vom 3. Fütterungstag bis zum 5. Tag nach Absetzen ermittelt, mit Bac. cereus vom 3. Fütterungstag bis zum 2. Tag nach Beendigung der Antibiotikum-Fütterung.

Der Erythromycin-Nachweis im Dotter gelang mit Sarc. lutea und Bac. subtilis p_H 6 vom letzten Fütterungstag bis zum 7. (Sarc. lutea) bzw. 9. Tag (Bac. subtilis p_H 6) nach Antibiotikum-Entzug. Mit Bac. subtilis p_H 8 wurden vom 5. Fütterungstag bis zum 10. Tag nach Fütterungs-ende positive Befunde erhoben.

Bac. cereus zeigte vom 2. - 8. Tag nach Erythromycin-Entzug Wachstumshemmungen im Dotter.

Tabelle 32: Verabreichung von 1,5 g Erythromycin pro kg Futter

Versuchs- tag	Gesamtzahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen					
		Sarc. lutea		Bac. subtilis PH 6		Bac. subtilis PH 8	
		EK	D	EK	D	EK	D
1	1						
2	4						
3	2	1 3,5		1 4,0		2 8,5	2 6,0
4	2					2 7,0	1 6,0
5	3		1 5,0	1 +		3 7,5	1 7,0
6	1						
7	5	1 3,5	1 5,0	1 +		1 8,0	1 5,0
8	4		4 3,5	2 3,0		5 11,0	4 5,0
9	1		4 3,5	4 3,5		4 10,0	4 11,0
10	2		1 3,5	1 3,5		1 7,5	1 10,5
11	4		2 3,5	2 3,0		1 4,0	2 7,5
12	1		3 3,5	4 2,5			4 10,0
13	4		1 3,5	1 2,5			1 10,0
14	2			2 +			4 10,0
15	5			1 +			2 7,0
16	3						

Verabreichung von 3,0 g Erythromycin
pro kg Futter

Tabelle 33: (siehe Seite 83)

Ergebnis: Bei insgesamt 5-tägiger Verabreichung von 3,0 g Erythromycin je kg Futter, entsprechend 360 mg pro Tier und Tag, gelang der Erythromycin-Nachweis sowohl im Eiklar als auch im Dotter.

Im Eiklar wurden mit allen Testkeimen ab 2. Versuchstag Hemmzonen gemessen. Die letzten Nachweise im Eiweiß waren mit *Bac. subtilis* p_H 6 am 4. Fütterungstag mit *Sarc. lutea* am 2., mit *Bac. cereus* am 3. und *Bac. subtilis* p_H 8 am 5. Tag nach Absetzen des Erythromycinhaltigen Futters möglich.

Im Dotter wurden mit *Sarc. lutea* und *Bac. subtilis* p_H 8 vom 3. Fütterungstag an bis zum 8. (*Sarc. lutea*) bzw. 9. Tag (*Bac. subtilis* p_H 8) nach Antibiotikum-Entzug Hemmzonen gemessen.

Mit *Bac. subtilis* p_H 6 und *Bac. cereus* wurden lediglich vom 4. Versuchstag bis zum 6. Tag nach Beendigung der Antibiotikum-Fütterung im Dotter Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen nachgewiesen.

Tabelle 33: Verabreichung von 3,0 g Erythromycin pro kg Futter

Versuchs- tag	Gesamt- zahl der Eier	Hemmzonen in mm bzw. Wachstumshemmungen					
		Sarc. lutea		Bac. subtilis PH 6		Bac. subtilis PH 8	
		EK	D	EK	D	EK	D
1	1	1 8,0		2 8,0		3 7,5	
2	3	4 8,0	1 5,0	2 4,5		3 7,5	
3	4						
4	2	2 5,0	3 8,0	2 3,5	1 3,5	2 6,0	2 +
5	4	3 6,0	4 8,0		1 4,0	1 5,0	3 +
6	1	1 3,5	1 4,5		1 4,0	1 6,0	1 +
7	3	2 5,0	3 5,0		2 4,0	2 6,5	2 +
8	2		2 8,5		1 4,0	2 9,5	1 5,0
9	3		2 8,0		1 3,5	2 10,5	2 5,0
10	4		3 7,0			3 9,5	3 +
11	4		4 7,0		1 +	4 10,0	3 +
12	2		2 4,0			2 6,0	
13	3		1 5,0			2 5,5	
14	2						
15	3						
16	4						

D

DISKUSSION

Im Gegensatz zu den verwertbaren Untersuchungsergebnissen von RAICA et al (1956) mit dem Blättchentest bewährte sich dieser in den eigenen Vorversuchen als Routine-Testmethode nicht.

Die unterschiedliche Viskosität des Eimaterials - Eiklar und Dotter - gestattete in den eigenen Versuchen nur mit Schwierigkeiten eine einheitliche Materialaufnahme durch die Testblättchen. Beim Auflegen der präparierten Blättchen auf den Nährboden entsteht zudem häufig ein Flüssigkeitsrand um das Blättchen, der ein Ablesen der Reaktion erschwert.

Da beim Agar-Lochtest, im Gegensatz zum Blättchentest, eine größere Menge des Untersuchungsmaterials aufgetragen werden kann, und nach den eigenen Ergebnissen in Tabelle 2 bis 5 bei gleicher Antibiotikum-Konzentration auch eine bessere Diffusion gewährleistet war, wurde dem Agar-Lochtest der Vorzug gegeben.

Vergleichsweise Untersuchungen mit unverdünntem und verdünntem Eimaterial zeigten, daß sich bei letzterem frühere und eindeutigere Hinweise auf Antibiotika-Rückstände ergaben.

MERKENSCHLAGER (1962) verdünnte in seinen Untersuchungen den Dotter mit Puffer im Verhältnis 1 : 4 und erzielte damit die besten Ergebnisse. Die Frage der Verdünnung des Eimaterials zur Verringerung der Viskosität und Verbesserung der Diffusion wurde in eigenen Versuchen überprüft. Aus den Tabellen 6 mit 11 geht hervor, daß mit steigender Verdünnung des Dotters, ausgehend von einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 2, die Hemm-

zonen bzw. die Wachstumshemmungen nur unwesentlich steigen. Deshalb wurde in den Routineansätzen mit dem Verdünnungsverhältnis 1 : 2 gearbeitet.

Von verschiedenen Autoren wird auf die Hitzeinaktivierung einiger Antibiotika hingewiesen (KLEIN 1957, HALLMANN 1961, WALTER und HEILMEYER 1965, KUNDRAT 1968). In den eigenen Versuchen wurde diese durch Hitzeinaktivierung bedingte Hemmzonen-Reduzierung reiner Antibiotika-Lösungen mit der Hitzeinaktivierung von Antibiotika-Eiklarlösungen verglichen. Von SCHELLHAAS (1973) wird letztere Methode zur Inaktivierung der Lysozyme benutzt.

Dabei zeigte sich, daß Penicillin, Chlortetracyclin und Erythromycin geringgradig inaktiviert wurden, Streptomycin und Chloramphenicol gemäß den Aussagen von WALTER und HEILMEYER (1965) jedoch keine Wirkungseinbuße erlitten, d.h. erhitzt und unerhitzt dieselben Hemmzonen ergaben.

In Versuchen mit Antibiotika-Eiklargemischen wurde bei den 15 Minuten auf 70°C erhitzten Penicillin-, Chlortetracyclin- und Erythromycin-Eiweißproben ebenfalls kleinere Hemmhöfe als beim unerhitzten Untersuchungsmaterial beobachtet.

Im Zusammenhang mit den von einigen Autoren (KLEIN 1957, HALLMANN 1961, WALTER und HEILMEYER 1965) erwähnten Aktivitätsverlusten der Antibiotika durch alkalische p_H -Werte, erscheint der p_H -Anstieg wie er hauptsächlich im Eiklar, vor allem nach längerer Lagerung bei höheren Temperaturen auftritt, bedeutsam. Dieser p_H -Anstieg im Eiklar dürfte sich auch auf die mikrobiologische Aktivität der Antibiotika auswirken, was sich wiederum in reduzierten Hemmzonen äußert.

Nach Tabelle 12 ist die Hemmzonenreduzierung nach Erhitzung von Antibiotika-Stammlösungen nur geringgradig, das heißt bei Chlortetracyclin von 16 auf 15 mm. Nach Tabelle 13 treten dagegen diese Unterschiede bei Erhitzung von Antibiotika-Eiweißgemischen stärker auf. Daraus läßt sich vermuten, daß der Zusatz von Eiklar mit seinem basischen p_H das im sauren Bereich liegende Wirkungsoptimum des Chlortetracyclins so einschränkt, daß es hier zu erheblich geringeren Hemmzonen kommt.

Die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesenen p_H -Wert-Anstiege von 7,9 auf 9,7 (Tabelle 15) im Eiklar nach Lagerung des Eies, stammen mit den von ERIKSON, ULLRIK und DAVIDSON (1965) aufgeführten Ergebnissen überein. Je höher die Lagerungstemperatur, desto schneller erfolgt der p_H -Anstieg in dem alkalischen Bereich (Tabelle 14).

Die in vorangegangenen Versuchen (Tabelle 3 - 5) beobachteten wesentlich größeren Hemmhöfe beim Eiklar dürften auf das Vorhandensein der Lysozyme im Eiweiß zurückzuführen sein.

Beachtenswert ist die unterschiedliche Größe der unspezifischen Hemmzonen bei den einzelnen Testkeimen. *Bac. subtilis* p_H 8 zeigte die größten Hemmhöfe und scheint somit empfindlicher auf die Lysozymaktivität des Eiklars zu reagieren als die anderen Testkeime (Tabelle 18).

Eine Inaktivierung der Lysozyme des Eiklars mit alkalischen p_H -Werten allein, wie sie von MEYER et al. (1936), jedoch beigleichzeitiger Erwärmung des Eimaterials empfohlen wird, zeigte keinen Erfolg. Versuche von GALYEAN et al. (1972) zu diesem Komplex verliefen ebenfalls negativ und bestätigen somit die eigenen Ergebnisse. Die aus eigenen Untersuchungen ersichtlichen, erheblichen p_H -Wert-Anstiege beim gelagerten Ei lassen demnach keine Lysozyminaktivierung durch Eilagerung erwarten.

SCHELLHAAS (1973) empfiehlt eine für Routine-Tests relativ aufwendige Methode der Lysozyminaktivierung. Nach den eigenen Versuchen mit dieser Technik bekommt das im Ultraturax homogenisierte Eiweiß nach 15-minütiger Erhitzung einen sauermilchähnlichen Zustand. Es läßt sich zwar mit der Pipette aufsaugen; infolge der Ausflockung stellen sich aber Zweifel hinsichtlich einer optimalen Diffusion der Antibiotika in das Nährmedium.

Außerdem wurde ein Dialysierschlauch für orientierende Versuche zum Zwecke der Lysozyminhibierung verwendet. Die Durchlässigkeit dieser Membran liegt bei einem Molekulargewicht von 5.000. Somit können Stoffe mit niedrigerem Molekulargewicht z.B. Antibiotika die Membran passieren, dagegen Lysozyme mit einem Molekulargewicht von 14.500 (JOLLE 1960) bzw. 14.700 nach HOFFMANN-OSTENHOF (1954) nicht. Diese theoretische Voraussetzung bestätigte sich bei den verschiedenen angewandten Folien jedoch nicht, d.h. im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tabelle 22 traten nach Tabelle 22a trotz Verwendung der Dialysierschläuche Hemmzonen auf.

Nach den Ausführungsbestimmungen A über die Untersuchung und gesundheitspolizeiliche Behandlung der Schlachttiere und des Fleisches bei Schlachtungen im Inland (AB.A1974), sind bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung erst Hemmzonen ab 2 mm als positiv zu bewerten. Damit sollen Hemmzonen unspezifischer Ursache nicht bewertet werden.

Da antibiotikumfreies Eiklar auf Grund der Lysozymwirkung Hemmzonen bis 3 mm ergibt (Tabelle 18), wurden bei den eigenen Fütterungsversuchen im Eiklar erst Hemmzonen über 3 mm ausgewertet.

Mit Dotter konnten keine unspezifische Reaktionen beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden in Ansätzen mit Eigelb auch Wachstums- hemmungen registriert.

Die in den eigenen Tierversuchen verwandten Antibiotika waren alle wasserlöslich. Die Dosierungen wurden relativ hoch gewählt, um mit Sicherheit Antibiotika-Rückstände im Ei zu erhalten und einen geeigneten Testkeim für Routineuntersuchungen zum Nachweis der gebräuchlichen Antibiotika zu finden. Die im 4. Versuch bei Bodenhaltung mit *Bac. subtilis* pH 6 und 8 durchgeführten Versuche wurden im 5. Versuch unter genauer kontrollierbaren Bedingungen bei Käfighaltung nachvollzogen und durch zwei unterschiedlich hohe Dosierungen der Medikamente die Empfindlichkeit mehrerer Testkeime gegenüber den einzelnen Antibiotika verglichen.

In den Tierversuchen erwies sich der Testkeim Bac. subtilis BGA als besonder geeignet, da mit ihm die höchste Zahl positiver Befunde erhoben wurde. Dies kann u.a. auch auf die p_H -Werte 6 und 8 der Nährmedien dieses Testkeims zurückgeführt werden, die den unterschiedlichen Wirkungsbereichen der Antibiotika entsprechen.

Der Nachweis von Streptomycin gelang lediglich im 2. Fütterungsversuch mit einer Dosis von 3,0 g Streptomycin pro kg Futter (Tabelle 31) und zwar nur am 4. und 5. Versuchstag mit Bac. subtilis p_H 8 im Eiklar. Verschiedene Autoren u.a. SCHREIBER (1957), HELWIG (1970) und VOGT et al. (1972) begründen dies mit der schlechten Resorption des Antibiotikums nach oraler Aufnahme. So konnten FRYE et al. (1957) mit Dosierungen von 1.000 ppm ebenfalls keinen positiven Nachweis führen.

Der Nachweis von Streptomycin-Rückständen nur mit Bac. subtilis p_H 8 im Eiklar wird aus dem bekannten optimalen Wirkungsbereich des Streptomycins bei p_H 7,8 (KLEIN 1857) erklärlich.

Chlortetracyclin ließ sich lediglich im Dotter nachweisen. Im Eiweiß scheint sich der mit Lagerung des Eies steigende alkalische p_H -Wert inaktivierend auf das Antibiotikum auszuwirken. (Tabelle 15) Der saure p_H -Wert des Dotters, wie er in eigenen Untersuchungen gemessen wurde, entspricht in etwa den Milieuansprüchen (p_H 2,5 bis 4,5 nach HALLMANN 1961) des Chlortetracyclins. Dies und nicht die Vermutung WOMACKS (1949), der eine Polysaccharidfraktion für die bessere Stabilisierung des Antibiotikums verantwortlich macht, scheint für den Chlortetracyclin-Nachweis im Eigelb ausschlaggebend zu sein.

Im Fütterungsversuch mit Bodenhaltung (Tabelle 24) konnten mit *Bac. subtilis* p_H 6 vom 1. - 4. Tag nach Absetzen von 3,0 g Chlortetracyclin pro kg Futter bei einem Teil der Dotter schwache Hemmzonen bzw. Wachstumshemmungen beobachtet werden.

Chlortetracyclin war als einziges Antibiotikum im Käfigversuch nicht mit *Bac. subtilis* BGA sondern nur mit *Bac. cereus* nachweisbar, der als spezifischer Nachweiskeim für Chlortetracyclin gilt (RAICA et al. 1956, OTTE 1960 und BRÜGGEMANN et al. 1963). Bei beiden Dosierungen waren vom 5. Fütterungstag bis zum 6. (Tabelle 30) bzw. bis zum 7. Tag (Tabelle 29) nach Absetzen in einem großen Teil der Dotter Rückstände meßbar. MERKENSCHLAGER (1962) fand durchschnittlich bis zum 4. Tag nach Chlortetracyclin-Entzug Antibiotikumkonzentrationen im Ei. Als Testkeim diente *Bac. cereus*. Dagegen konnten DURBIN et al. (1953) nach Verfütterung von 200 ppm Chlortetracyclin bereits 2 Tage nach dem Absetzen keine mikrobiologisch wirksamen Rückstände mehr feststellen.

Penicillin-Rückstände im Ei wurden im 2. Fütterungsversuch bei einer Dosierung von 3,0 g Penicillin pro kg Futter ermittelt (Tabelle 28). Der Nachweis gelang im Gegensatz zu den Untersuchungen von SCHELLHAAS (1973) nur im Dotter und zwar ab dem 1. Tag nach Absetzen des Antibiotikums. Mit *Bac. subtilis* p_H 6 konnte die Ausscheidung des Penicillins bis zum 2., mit *Sarc. lutea* bis zum 3. und mit *Bac. subtilis* p_H 8 bis zum 4. Tag nach Absetzen des Medikaments gemessen werden, wobei *Bac. subtilis* p_H 8 die größten Hemmzonen zeigte, obwohl dieses Antibiotikum nach KUNDRAT (1968) im sauren Bereich am wirksamsten sein soll.

Während am ersten Tag nach Absetzen des Medikaments alle Eidotter Penicillin-Rückstände aufwiesen, wurden am 3. Tag nur mit *Sarc. lutea* und *Bac. subtilis* p_H 8 in allen Eiern Rückstände gemessen.

Die Untersuchungen von WONG et al. (1953) zeigten, daß nach Verfütterung von 1.000 ppm keine positiven Befunde auftraten. SCHELLHAAS (1973) konnte nach nur 3-tägiger Penicillin-Verabreichung das Pharmakon sowohl im Eidotter als auch im Eiklar nachweisen. Er verabreichte jedoch das Medikament über die Schlundsonde und konnte somit die Höhe der aufgenommenen Menge (300.000 I.E. Penicillin) genau bestimmen, während in den eigenen Versuchen Schwankungen seitens der Nahrungsaufnahme nicht auszuschließen sind.

Der Erythromycin-Nachweis gelang bei allen Versuchsansätzen sowohl im Dotter als auch im Eiklar. Im Eiklar waren je nach Dosierung frühestens ab dem 2. Fütterungstag bis maximal 5 Tage nach Absetzen des antibiotikumhaltigen Futters Erythromycin-Rückstände nachweisbar. Die Antibiotikumablagerung im Eiweiß steht ähnlich wie beim Dotter in zeitlichem Zusammenhang mit dem Bildungsprozeß des Eiklars. Im Dotter wurden durchschnittlich 8 Tage bis maximal 10 Tage nach Entzug des Antibiotikums Erythromycin-Rückstände gemessen. Dies stimmt mit den Versuchsergebnissen von GODGLÜCK (1972) überein, der noch 8 Tage nach Erythromycin-Entzug Nachweise im mikrobiologischen Versuchsansatz erbringen konnte. Die in eigenen Versuchen gute Nachweisbarkeit des Erythromycins steht im Gegensatz zu den Ausführungen von VOGT et al. (1972),

nach denen dieses Antibiotikum aufgrund seiner schnellen Ausscheidung aus dem Körper kaum Rückstände verursachen dürfte. Mit *Bac. subtilis* p_H 8 zeigte das Eiweiß bzw. der Dotter nahezu aller Eier Erythromycin-Rückstände. Außerdem wurden beim Erythromycin-Nachweis mit *Bac. subtilis* p_H 8 die größten Hemmzonen und die längste Ausscheidungszeit ermittelt. Dies spricht für eine besondere Empfindlichkeit des Testkeims gegenüber Erythromycin und für eine p_H -Abhängigkeit des Antibiotikums, das bei p_H 8 (KLEIN 1957, SCHAAL 1973) seine größte mikrobiologische Aktivität entfalten soll.

Chloramphenicol-Rückstände wurden im Fütterungsversuch mit Bodenhaltung nur im Dotter und zwar bei einer relativ geringen Zahl der Eier beobachtet. Im Fütterungsversuch mit Käfighaltung waren bei beiden Dosierungen sowohl im Dotter als auch im Eiklar Chloramphenicol-Konzentrationen nachweisbar. Letzteres stimmt mit den Versuchsergebnissen von GODGLÜCK (1972) überein. Rückstände im Eiklar wurden jedoch nur bei Verwendung von *Bac. subtilis* p_H 8-Nährböden beobachtet. Am 3. Tag nach Entzug des Antibiotikums waren bei der Dosierung von 1,5 g Chloramphenicol pro kg Futter die Eidotter als auch das Eiklar aller Eier positiv. Nach Verabreichung von 3,0 g Chloramphenicol pro kg Futter zeigten vom 1. - 5. Tag nach Absetzen des Antibiotikums der größte Teil der Dotter Chloramphenicol-Rückstände. Ähnlich wie GODGLÜCK (1972), der in Abhängigkeit von der Chloramphenicol-dosierung 2 bzw. 6 Tage lang nach dem Absetzen des Medikaments die letzten Antibiotika-Spuren im Eigelb nachwies, konnten bei den hier aufgeführten Ver-

suchen bis zum 6. bzw. 7. Tag nach Chloramphenicol-Entzug Rückstände im Dotter gemessen werden. Die durch das Chloramphenicol im 2. Fütterungsversuch verursachten Hemmhöfe waren bei beiden p_H -Werten des *Bac. subtilis*-Nährbodens in etwa gleich groß. Dies bestätigt die von SCHAAL (1973) beschriebene Unabhängigkeit gegenüber den beiden Nährmedien. Auch *Sarc. lutea* zeigte wie von GROVE und RANDALL (1955) beschrieben, eine relativ gute Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol.

Die von RAICA et al. (1956) gemachte Beobachtung, daß der Antibiotikumnachweis im Ei abhängig vom Dotterbildungsprozeß ist, wird in den Versuchen mit Erythromycin und Chloramphenicol deutlich.

Die größten Hemmzonen traten beispielweise bei Erythromycin in der Zeit vom 5. Fütterungstag bis 4 Tage nach Absetzen des Medikaments auf. Die Meßwerte stiegen an, fielen dann langsam wieder ab und waren am 10. Tag nach Absetzen des Medikaments negativ (Tabelle 33). Das Eiklar, das im Gegensatz zum Eigelb erst relativ spät gebildet wird, zeigt schon ab dem 2. Tag Antibiotika-Rückstände, die jedoch spätestens 4 - 5 Tage nach Antibiotika-Entzug nicht mehr nachweisbar sind. Beginn und Ende der meßbaren Antibiotika-Ausscheidung sind selbstverständlich abhängig von der Empfindlichkeit des jeweiligen Testkeims und der Nährmedien.

E

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Versuchen über die physikalische und chemische Beeinflussung der Hemmhofgröße wurden Legehennen in Boden- und Käfighaltung jeweils 5 Tage lang mit unterschiedlicher Dosis von Chloramphenicol, Penicillin, Chlortetracyclin, Streptomycin und Erythromycin gefüttert und die Eier, getrennt in Eiweiß und Eigelb, mit mikrobiologischen Methoden auf Antibiotikum-Rückstände untersucht.

Als Testkeime dienten *Sarc. lutea* ATCC 9341, *Bac. subtilis* BGA (Agar p_H 6 und 8) und *Bac. cereus* ATCC 11778.

Die Untersuchungen ergaben:

1. Der Agar-Lochtest eignet sich für Reihenuntersuchungen zum Hemmstoffnachweis im Ei besser als der Blättchentest.
2. Zur Verbesserung der Hemmstoffdiffusion in das Nährmedium sollte der Dotter mit gleichen Teilen physiol. NaCl-Lösung verdünnt werden.
3. Der lagerungsbedingte p_H -Wert-Anstieg des Eiklars im alkalischen Bereich führte bei Chlortetracyclin- und Penicillin-Verabreichung zu negativen Nachweisen im Eiklar.
4. Lysozyme im nativen Eiklar bewirken unspezifische Hemmhöfe im mikrobiologischen Hemmstofftest bis zu einer Hemmzonenbreite von 3 mm. Ihre Inhibierung durch p_H -Wert-Verschiebung befriedigte in den vorliegenden Untersuchungen nicht. Nur die aus der Literatur bekannte Erhitzung des Eiklars auf 70°C verhinderte Lysozym-bedingte Hemmhöfe,

reduzierte jedoch gleichzeitig die mikrobiologische Aktivität der in den eigenen Versuchen eingesetzten Penicillin-, Chlortetracyclin- und Erythromycin-Formulierungen.

5. Unter den gut kontrollierbaren Bedingungen der Käfighaltung ließ sich in diesem Modellversuch mit *Bac. subtilis* BGA Streptomycin (3 g/kg Futter) nur im Eiklar bei einem Nährboden- p_H -Wert von 8, Penicillin (3 g/kg Futter) im Dotter bei p_H 6 und 8; Chloramphenicol (1,5 g/kg und 3,0 g/kg Futter) im Dotter bei p_H 6 und 8, im Eiklar nur bei p_H 8; Erythromycin (1,5 g/kg und 3,0 g/kg Futter) im Dotter und Eiklar bei p_H 6 und 8 nachweisen. Bei Bodenhaltung und Chlortetracyclin-Verabreichung (3 g/kg Futter) wurden ebenfalls mit *Bac. subtilis* p_H 6 im Dotter positive Befunde erhoben. Niedrigere Dosen von Chlortetracyclin (1,5 g/kg Futter) konnten nur mit *Bac. cereus* ATCC 11778 nachgewiesen werden. *Sarc. lutea* ATCC 9341 ist gut geeignet zum Nachweis von Erythromycin und Chloramphenicol im Ei, ist in der Empfindlichkeit jedoch *Bac. subtilis* BGA unterlegen.
- C. Bei Vereinheitlichung des Hemmstoffnachweises im Ei auf einen Testkeim ist nach den eigenen Untersuchungen *Bac. subtilis* BGA bei einem p_H -Wert von 6 und 8 der geeignetste Testkeim.

SUMMARY

After initial experiments on physical and chemical influences on the size of the zones of inhibition, layer hens kept in batteries and on the ground were fed different doses of chloramphenicol, penicillin, chlortetracyclin, streptomycin, and erythromycin. The eggs were separated into egg white and yolk and examined for antibiotic residues by microbiological methods.

Sarc. lutea ATCC 9341, *Bac. subtilis* BGA (agar p_H 6 and 8), and *Bac. cereus* ATCC 11778 were used as test strains.

Results:

1. The agar perforation test is better suited for routine screenings for inhibitory substances in eggs than the paper disk test.
2. Yolk should be diluted with equal parts of physiological saline in order to improve diffusion of the inhibitor into the medium.
3. The rise in the alkaline egg white p_H due to storage led to negative results in trials with application of chlortetracycline and penicillin.
4. In microbiological growth inhibition assays unspecific zones of inhibition up to a width of 3 mm can be caused by lysozymes present in native egg white. Efforts undertaken to inhibit these lysozymes by a shift in p_H led to unsatisfactory results. Only heating of the egg white up to $70^{\circ}C$ (as published in the literature) could prevent zones of inhibition due to lysozymes. At the same time, however, this procedure reduced the antimicrobial activity of the formulas of

penicillin, chlortetracycline, and erythromycin used in the experiments.

5. When the layer hens were kept in batteries under well controlled conditions, in this model-experiment the presence of antibiotics in the eggs could be demonstrated by the use of *Bac. subtilis* BGA as follows: streptomycin in a concentration of 3.000 ppm in feed only in egg white at a medium- p_H of 8; penicillin in a concentration of 3.000 ppm in feed only in yolk at a medium- p_H of 6 and 8; chloramphenicol in a concentration of 1.500 ppm and 3.000 ppm in yolk at a medium p_H of 6 and 8, in egg white only at p_H 8; erythromycin in a concentration of 1.500 ppm and 3.000 ppm in yolk and egg white at a medium- p_H of 6 and 8. When the hens were running on the ground, and chlortetracycline was fed to them at a concentration of 3.000 ppm, positive inhibition results were obtained in yolk with *Bac. subtilis* BGA at p_H 6.
Lower concentrations of chlortetracycline (1.500 ppm) could be demonstrated with *Bac. cereus* ATCC 11778 only.
Sarc. lutea ATCC 9341 is well suited for the detection of erythromycin and chloramphenicol in eggs, however its sensitivity is inferior to that of *Bac. subtilis* BGA.
6. If the microbiological growth inhibition test in eggs is to be standardized, the most suited test strain was found to be *Bac. subtilis* BGA at medium p_H 6 and 8.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABDERHALDEN, R. : Klinische Enzymologie, Thieme Verlag (1958)
- ABRAHAM, E.P. und R. ROBINSON (1937) zit. n.
HOFFMANN-OSTENHOF, O. :
Enzymologie-Eine Darstellung für
Chemiker, Biologen und Mediziner,
Springer Verlag (1954)
- ALDERTON, G., W.H. WARD und H.L. FEVOLD: J. Biol.
Chem. 157,43-58 (1954)
- AMMON, R. und W. DIRSCHEL : Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser
Wirkstoffe zueinander, Thieme Verlag (1959)
- ANONYM :
Ausführungsbestimmungen A über
die Untersuchung und gesundheitspolizeiliche Behandlung der
Schlachttiere und des Fleisches
bei Schlachtungen im Inland AB.A
- BONFERT, W. und K. BERANG : Arch. Lebensmittelhyg.
20,61-63 (1969)
- BORDET, M. zit. n. COTTERILL, O.J. und A.R. WINTER :
Poult. Sci. 33,1185-1190 (1954)
- BROQUIST, H.P. und A.R. KOHLER (1953) zit. n. RAICA, N.,
B. HEYWANG und A.R. KEIMERER :
Poult. Sci. 35,884-886 (1956)
- BRÜGGEMANN, J. und M. MERKENSCHLAGER : Arch. Lebensmittelhyg. 9,197-199 (1958)
- BRÜGGEMANN, J., M. MERKENSCHLAGER und K.H. NIESAR :
Zbl. Vet. Med. 10,631-684 (1963)
- CORETTI, K. : Fleischwirtschaft 13,119-122 (1961)
- COTTERILL, O.J. und A.R. WINTER : Poult. Sci.
33,607-611 (1954)

- dieselben : Poult. Sci. 33,1185-1190 (1954)
- CUNNINGHAM, F.E. und H. LINEWEAVER : Poult. Sci.
46,1471-1476 (1967)
- CUNNINGHAM, F.E. und O.J. COTTERILL : Poult. Sci.
50,1013-1016 (1971)
- DRAHEIM, R. : M.-hefte der Vet.-Med.
26,511-514 (1971)
- DURBIN, C.G., J.J. DILORENZO, W.A. RANDALL und
J. WILNER : Antibiotic Annual
428-432 (1953/1954)
- BRUNSO et al. zit. n. GRZIMEK, E. : Das Eierbuch,
Verlag Fritz Pfenningstorff (1964)
- FANGAUF, R. : Antibiotika in der Tierernährung,
Münchener Symposion 67-80 (1954)
- FLEMING, A. (1922), zit. n. SCHAAAL, M. : Diss. Vet.
Med., Hannover (1972)
- FLEMING, A. und V. D. ALLISON (1924) zit. n.
GALYEAN, G. R., O.J. COTTERILL und
F.E. CUNNINGHAM : Poult. Sci. 51,
1346-1352 (1972)
- FRAENKEL-CONRAT, H., A. MOHAMD, E.D. DUCAY und
D.K. MECHAN : J. Am. Chem. Soc. 2,
625-627 (1951)
- FRIERIKSEN, E. : Münchener Symposion, 21-46 (1954)
- FRYE, G.G., H.H. WEISER und A.R. WINTER : Poult. Sci. 37,
633-637 (1958)
- GALYEAN, G.R., O.J. COTTERILL und F.E. CUNNINGHAM :
Poult. Sci. 51,1346-1352 (1972)
- GERLACH, H. : Berl. Münchener Tierärztl. Wschr.
80, 231-234 (1967)
- GISSKE, W., S. WENZEL, J. PICHNARCIC, J. SCHAPER und
E. ENNEN : Arch. Lebensmittelhyg.
21, 25-30 (1970)
- GODGLÜCK, G. : Bundesgesundheitsblatt 15,
355-357 (1972)

- GRADY und WILLIAMS (1953) zit. n. RAICA, N., B.W.
HEYWANG und A.R. KEMMERER:
Poult. Sci. 35, 884-888 (1956)
- GROVE, D.C. und W.A. RANDALL: Assay methods of anti-
biotics, Medical Encyclopedia, Inc.,
New York (1955)
- HALLMANN, L. : Bakteriologie und Serologie, Thieme
Verlag (1961)
- HAVERMANN, H. und H.W. SCHARPENSEEL : Arch. Geflügel-
kunde, Jahrg. 17, 193-200 (1953)
- HELWIG, H. : Antibiotika-Chemotherapeutika,
Grundlagen-Anwendung-Gefahren,
Thieme Verlag (1970)
- HOFFMANN-OSTENHOF, O. : Enzymologie, Springer Verlag
(1954)
- ILLES, E.M. und M. SZENT-IVANY (1969) zit. n. SCHAAAL, M.:
Diss. Vet. Med., Hannover (1972)
- JACKSCH, W. : Wiener Tierärztl. Mschr. Jahrg. 58,
298-309 (1971)
- JÄGER, P. : Diss. Vet. Med., München (1972)
- JOLLE, P. (1960) zit. n. CUNNINGHAM, F.E. und H. LINE-
WEAVER : Poult. Sci. 46,
1471-1476 (1967)
- JUKES, T.H. : Antibiotika in der Tierernährung,
Münchener Symposion, 7-20 (1954)
- KAMPELMACHER, F.H., F. GUINEE, A.M. NOORLE und L.M.
van JANSEN (1962) zit. n. KIND, H. :
M.-hefte Vet.-Med. 21, 903-910 (1966)
- KELCH, F. und K. CORETTI (1959) zit. n. KIND, H. :
M.-hefte der Vet.-Med. 21, 903-910
(1966)
- KIND, H. : M.-hefte der Vet.-Med. 21, 903-910
(1966)

- KLEIN, P. : Bakteriologische Grundlagen der
chemotherapeutischen Laboratoriums-
praxis, Springer Verlag (1957)
- KLIMA, H. (1966) zit. n. KIND, H. : M.-hefte der Vet.-
Med. 21,903-910 (1966)
- KNOTHE, H. und J. MAHLER : Dtsch. Med. Wschr. 84,
1678-1681 (1959)
- KNOTHE, H. : Zeitschr. Tierphys.,-ernährung
und Futtermittelkunde 21,263-326
(1966)
- KOTTER, L. : Wiener Tierärztl. Mschr. 60,
62-66 (1973)
- KRAAK, J. und A. TOLLE : Milchwissenschaft
22,669-673 (1967)
- KRIEG, R. : Arch. Geflk. 31,166-176 (1966)
- dieselbe : Arch. Geflk. 5,171-174 (1972)
- KUNDRAT, W. : Ztschr. Anal. Chem. 243,624 (1968)
- derselbe : Fleischwirtschaft 52,485-487 (1972)
- LAI, K.W., H. LÜDERS und K.H. HINZ, Dtsch. Tierärztl.
Wschr. 17,433-435 und 18,452-455
(1972)
- LANG, K. : Milchwissenschaft 22,230-237 (1967)
- LASCHTSCHENKO, P. (1909) zit. n. ABDERHALDEN, R. :
Klinische Enzymologie Thieme Verlag
(1958)
- LEVETZOW, R. : Bundesgesundheitsblatt 15/16,
211-213 (1971)
- MERKENSCHLAGER, M. : Habil.-Schr., München (1962)
- MEYER (1936) zit. n. COTTERILL, O.J. und A.R. WINTER :
Poult. Sci. 33,1185-1190 (1954)
- MEYER, K. und E. HAHNEL (1946) zit. n. HOFFMANN-
OSTENHOF, O. : Enzymologie-Eine
Darstellung für Chemiker, Biologen
und Mediziner, Springer Verlag
(1954)

- MEYER, B., W. THIEL und W. WEISS : Fleischwirtschaft 2, 203-206 (1970)
- OTTE, H.J. : Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 180, 569-581 (1960)
- OVERBY, A.J. : J. Dairy Sci. Abstr. 16 (1954)
- RAICA, N., B. HEYWANG und A.R. KEMMERER : Poult. Sci. 35, 884-888 (1956)
- RETTGER und SPERRY (1912) zit. n. ABDERHALDEN, R. : Klinische Enzymologie Thieme Verlag (1958)
- ROWLANDS, S., ROWLEY und H. STEWART (1948) zit. n. SCHAAL, M. : Diss. Vet.-Med., Hannover (1972)
- SABATH, C.D., R.B. LODER, D.A. GERSTEIN und M. FINLAND : J. Appl. Microbiol. 16, 877-880 (1968)
- SAIF, Y., S.M. NESTOR und Mc. CRACKEN : Poult. Sci. 49, 1641-1649 (1970)
- SCHAAL, M. : Diss. Vet.-Med., Hannover (1972)
- SCHELLHAAS, G. : Kongressbericht, Bad Nauheim (1973)
- SCHREIER, G. : Berl. Münchener Zo. 415-418 (1967)
- SMITH (1931) zit. n. FROMM, D. und S.V. GAMMON : Poult. Sci. 47, 1191-1196 (1968)
- SMOLESIS, A.N. und S.E. HARTSELL (1949) zit. n. COTTERILL, O.J. und A.R. WINTER : Poult. Sci. 33, 607-611 (1954)
- STORGARDS, T. : Milchwissenschaft 17, 309-378 (1962)
- STURKIE, F.D. : Avian Physiology, Sec. edition, Comstock Publishing, Associates I. HACA, New York (1965)
- TACACS, J. und S. KOVACS : Acta Vet. Acad. Hung. 19, 11-19 (1969)
- TERPLAN, G., K.J. ZAADHOF, H. ANGERSBACH und M. SKARLAKIDOU : Arch. Lebensmittelhyg. 4, 90-92 (1973)

- ULLRIK und DAVIDSEN zit. n. GRZIMEK, B. : Das Eierbuch Verlag Pfenningstorff (1964)
- VOGT, H., R. KRIEG, W. RAUCH : Berichte über Landwirtschaft, Paul Parey Verlag 734-746 (1972)
- VOITTELLIER, GOYAT, DEVAUX zit. n. GRZIMEK, B. : Das Eierbuch, Verlag Pfenningstorff (1964)
- WALTER, A.M. und L. HEILMEYER : Antibiotika-Fibel Antibiotika und Chemotherapeutika Thieme Verlag (1965)
- WARREN und KONRAD (1939) zit. n. RAICA, N., W. HEY-WANG und A.R. KEMMERER : Poult. Sci. 35,884-888 (1956)
- WILCOX und COLE : Poult. Sci. 33,392-397 (1954)
- WILCOX (1956) zit. n. SAUTER, E.A. und PETERSEN, C.F. : Poult. Sci. 51,957-960 (1972)
- WOMACK, C.R., E.H. KASS, E.B. WELLS und M. FINLAND : Proc. Soc. Exp. Med. 72-706-708 (1949)
- WONG, S.C., R.C. KERSEY, J.R. McMAHAN, W.M. REYNOLDS, W.K. WARDEN und J. McCINNIS : Fed. Proc. Vol. 12,434 (1953)

Lebenslauf

Am 29. März 1947 wurde ich, Christel Müller - Held, als Tochter des Pfarrers Karl Held und seiner Ehefrau Edith geb. Pieper in Krefeld-Ürdingen geboren. Von 1953 - 1957 besuchte ich die Volksschulen in Ohl/Rönsahl und Betzdorf/Sieg.

Nach der 4. Klasse wechselte ich zur Städt. Realschule Betzdorf/Sieg. Dort erwarb ich 1963 die Mittlere Reife.

Der 3jährige Besuch des Aufbauzweiges für Realschulabsolventen des Fürst-Johann-Moritz-Gymnasium in Weidenau endete im März 1966 mit der Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Universität in Gießen das Studium der Veterinärmedizin.

Nach bestandener tierärztlicher Vorprüfung im Frühjahr 1969 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Dort legte ich im März 1972 das tierärztliche Examen ab.

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1972 - 1974.

